

STANDARDISIERUNG UND PRÜFUNG
EINES SCHNELLEN UND BILLIGEN VERFAHRENS
ZUR DIREKTEN
RADIOIMMUNOLOGISCHEN BESTIMMUNG
VON CORTISOL IN PLASMA ODER SERUM
OHNE EXTRAKTION

Bernhard Auchter

1978

Aus der Kinderklinik im Dr.v. Haunerschen Kinderspital
der Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. Klaus Betke

Titel der Arbeit

Standardisierung und Prüfung eines schnellen und billigen
Verfahrens zur direkten radioimmunologischen Bestimmung
von Cortisol in Plasma oder Serum ohne Extraktion

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

 vorgelegt von

Bernhard Auchter

aus

Ravensburg

im Jahre 1978

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin der Universität
München

Berichterstatter : Priv.-Doz.Dr.F.BICHLINGMAIER

Mitberichterstatter: Prof.Dr.K.BETKE

Dekan: Prof.Dr.W.SPANN

Tag der mündlichen Prüfung: 30.5.1978



MEINEN ELTERN



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Vorwort

An dieser Stelle möchte ich Herrn Professor Dr. med. K. Betke dafür danken, daß er mir die Arbeit an seiner Klinik ermöglichte.

Herrn Privatdozent Dr. med. F. Bidlingmaier danke ich für die Überlassung des Themas und die freundliche Unterstützung beim Fortgang der Arbeit.

Den Damen des Hormonlabors der Kinderklinik, besonders Frau I. Stoll und E. Grove, spreche ich meinen Dank aus für die freundliche Aufnahme und gute Zusammenarbeit in der täglichen Praxis.

Nicht zuletzt gilt mein Dank all denen, die mir mit Rat und Tat hilfreich zur Seite standen, hier ganz besonders Herrn und Frau Frey, sowie Frl. Dr. med. R. Haslbeck.

Abkürzungsverzeichnis

ACTH	= adrenocorticotropes Hormon
AGS	= adrenogenitales Syndrom
AK	= Antikörper
CBG	= Corticosteroid-bindendes Globulin
cpm	= counts per minute
CRF	= Corticotropin-releasing factor
DHA	= Dehydroepiandrosteron
Fluorim.M.	= Fluorimetrische Methode
NS	= Nervensystem
NNR	= Nebennierenrinde
OHCS	= Hydroxycorticosteroide
RIA	= Radioimmunoassay
VP	= Versuchsperson
ZNS	= Zentralnervensystem

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. <u>Einleitung und Fragestellung</u>	1
2. <u>Allgemeines</u>	3
2.1. Biosynthese und Sekretion von Cortisol	3
2.2. Methoden zur Bestimmung von Cortisol	6
3. <u>Methodik</u>	12
3.1. Material	12
3.1.1. Reagenzien	12
3.1.2. Lösungen	13
3.1.3. Geräte	15
3.2. Versuchsablauf	17
3.2.1. Vorbereitung und Enteiweissung der Proben	17
3.2.2. Radioimmunologische Messung	18
3.3. Vorversuche zur Optimierung des Versuchsablaufes	22
3.3.1. Volumen- und Konzentrationsänderungen durch den Kochvorgang	22
3.3.2. Denaturierung der Cortisolbindenden Proteine	25
3.3.3. Hitzestabilität von Cortisol	28
3.4. Das Antiserum	31
3.4.1. Titerhöhe des Antiserums AK 127	31
3.4.2. Spezifität	33

3.5.	Inkubationstemperaturen und pH-Bereiche im Radioimmuno- assay (RIA)	35
3.6.	Inkubationsdauer des Cortisol- Antikörper-Gemisches	36
3.7.	Zeitabhängigkeit der Trennung von freiem und Antikörper- gebundenem Cortisol durch Dextran-Kohle	36
3.8.	Qualitätskontrolle der Methode	39
3.8.1.	Wiederfindung zugesetzter Mengen an Cortisol	39
3.8.2.	Präzision innerhalb der Serie	41
3.8.3.	Präzision von Tag zu Tag	41
4.	<u>Vergleich mit anderen RIA- Methoden</u>	44
4.1.	Vergleich "Schnell-Assay" zu "neuem Assay"	48
4.2.	Vergleich "chromatographischer Assay" zu "neuem Assay"	49
4.3.	Vergleich der Ergebnisse von Dreifach-Bestimmungen mit denen von Zweifach-Bestimmungen im "neuen Assay"	50
4.4.	Dexamethason- und Synacthen- Teste im Wertevergleich zwischen "neuem Assay" und "chromato- graphischem Assay"	51
4.4.1.	Synacthenteste	51
4.4.2.	Dexamethasonteste	53

III

	Seite
4.5.	Normalwerte 54
4.6.	Tagesprofile 57
4.7.	Vergleichende Cortisolmessung in Serum und Plasma. Einfluss einer 24 - h - Lagerung auf die Cortisol-Konzentration im Serum 58
4.8.	AGS-Plasmen 60
5.	<u>Kostenberechnung</u> 62
5.1.	Materialien 63
5.2.	Praktikabilität 64
5.3.	Wertung 64
6.	<u>Zusammenfassung</u> 65
7.	<u>Tabellen</u> 66
8.	<u>Verdünnungsreihen</u> 82

1. Einleitung und Fragestellung

Die Bestimmung der Steroidhormone der Nebennierenrinde nimmt einen wichtigen Platz in der Hormonanalyse ein. Das gilt vor allem für das quantitativ am stärksten vertretene Glucokortikoid, das Cortisol. Neben der Sekretion der Steroide durch die Nebennierenrinde wirken sich noch viele andere Faktoren auf die Steroidkonzentration in Blut und Urin aus, so z.B. Änderungen der Kreislaufdynamik, enzymatische Umsetzungen in der Leber und in anderen peripheren Organen oder Schwankungen der Nierenfunktion. Um trotz dieser vielfältigen Wechselwirkungen eine Aussage über die Nebennierenfunktion treffen zu können, setzt man die zwar keineswegs immer zutreffende, für die Praxis aber im allgemeinen ausreichende Annahme voraus, dass die im peripheren Kreislauf zirkulierenden bzw. die im Urin ausgeschiedenen Steroide und Steroidmetaboliten eine qualitativ und quantitativ definierte Beziehung zur sekretorischen Aktivität der Nebennierenrinde aufweisen und bestimmt daher die Hormone im Blut oder Urin (6).

Die Interpretation der Cortisolanalysen wird durch den zwischen verschiedenen Personen relativ grossen Schwankungsbereich der "Normalwerte", durch die intra-individuellen tageszeitlichen und die zum Teil erheblichen von-Tag-zu-Tag-Schwankungen erschwert. Einmalige Steroidbestimmungen eignen sich deshalb nur zur Erfassung ganz grober Hypo- und Hyperfunktionen, nicht aber zum Nachweis der viel häufigeren, geringgradigen Funktionsstörungen (6). Zur Erfassung der Nebennierenrindentätigkeit bei adipösen Patienten und zur Abgrenzung der alimentären Adipositas vom Cushing-Syndrom sind Cortisol-Tagesprofile wesentlich aufschlussreicher. Dabei fallen pro Patient und Tag jeweils vier bis sechs Proben an.

Als besonders nützlich zur Differentialdiagnose zwischen Adipositas simplex und dem Cushing-Syndrom hat sich die Cortisolmessung vor und nach Suppression des hypothalamisch-hypophysären Systems mit Dexamethason erwiesen (41, 42).

Zur Unterscheidung zwischen primärer (M. Addison) und sekundärer Nebennierenrindeninsuffizienz (z.B. bei Hirntraumen und -tumoren, Simmonds'scher Krankheit, postpartalem Sheehan-Syndrom) trägt die Cortisolbestimmung vor und nach Stimulation mit dem ACTH-Analogen Tetraacosactrin (Synacthen^R) bei. Sowohl beim Dexamethason-, als auch beim Synacthentest fällt jeweils neben dem Basiswert mindestens eine weitere Bestimmung nach Suppression bzw. Stimulation an.

In neuerer Zeit gewinnt die Suche nach heterozygoten Merkmalsträgern für das kongenitale adrenogenitale Syndrom (AGS) vom Typ des 21-Hydroxylase-Defektes immer mehr an Bedeutung. Hierfür wurde im endokrinologischen Labor der Kinderklinik ein Test entwickelt, bei dem 17-OH-Progesteron und Cortisol vor und nach Synacthen^R-Stimulation bestimmt werden (29). Die grosse Häufigkeit der homozygot Erkrankten von etwa 1:5000 (46) bis 1:7500 (33) und der heterozygoten Merkmalsträger von etwa 1:40 (46) bzw. 1:50 (33) macht die genetische Beratung von Erkrankten und deren Angehörigen besonders wichtig.

Bei Patienten mit kongenitalem adrenogenitalem Syndrom kann es während der Cortisoltherapie sinnvoll sein, das Tagesprofil des Cortisols im Plasma nach exogener Substitution zu überwachen.

Alle genannten Beispiele zeigen, dass nicht nur die Fragestellung für eine Cortisolbestimmung häufig ist, sondern dass es im allgemeinen auch einer Vielzahl von Cortisolbestimmungen pro Patient bedarf, um zu einer für Diagnose

oder Therapieüberwachung brauchbaren Aussage zu kommen. Eine Methode zur Messung von Cortisol muss daher praktikabel sein, das heisst

- sie muss rasch durchführbar sein,
- sie muss kostengünstig sein,
- die benötigten Blutvolumina dürfen keine unzumutbare Belastung für den Patienten, speziell in der Kinderheilkunde für den Säugling oder das Kleinkind, darstellen,
- und sie darf zu ihrer Durchführung keine besonders grosse Geschicklichkeit voraussetzen.

Die Aufgabe der vorliegenden Arbeit ist es, eine Methode zur Messung des Cortisols direkt in Blutplasma bzw. -serum, unter Verzicht auf Extraktion und chromatographische Vorreinigung, zu erstellen und die Brauchbarkeit der Methode für die paediatrische Endokrinologie zu prüfen. Die Probenvorbereitung erfolgte nach einem von FOSTER und DUNN beschriebenen Prinzip (17). Für die Messung selbst wurde die hohe Spezifität und Sensitivität einer radioimmunologischen Methode genutzt.

2. Allgemeines

2.1. Biosynthese und Sekretion von Cortisol

Cortisol ist ein C_{21} -Steroid, das in der Zona fasciculata der Nebenniere gebildet wird. Ausgangsstoff ist die "aktivierte Essigsäure", das Acetyl-CoA. Über Cholesterin, Pregnenolon und 17-alpha-OH-Progesteron wird schliesslich durch C_{21} - und C_{11} -Hydroxylierung das Cortisol synthetisiert (Abb. 1).

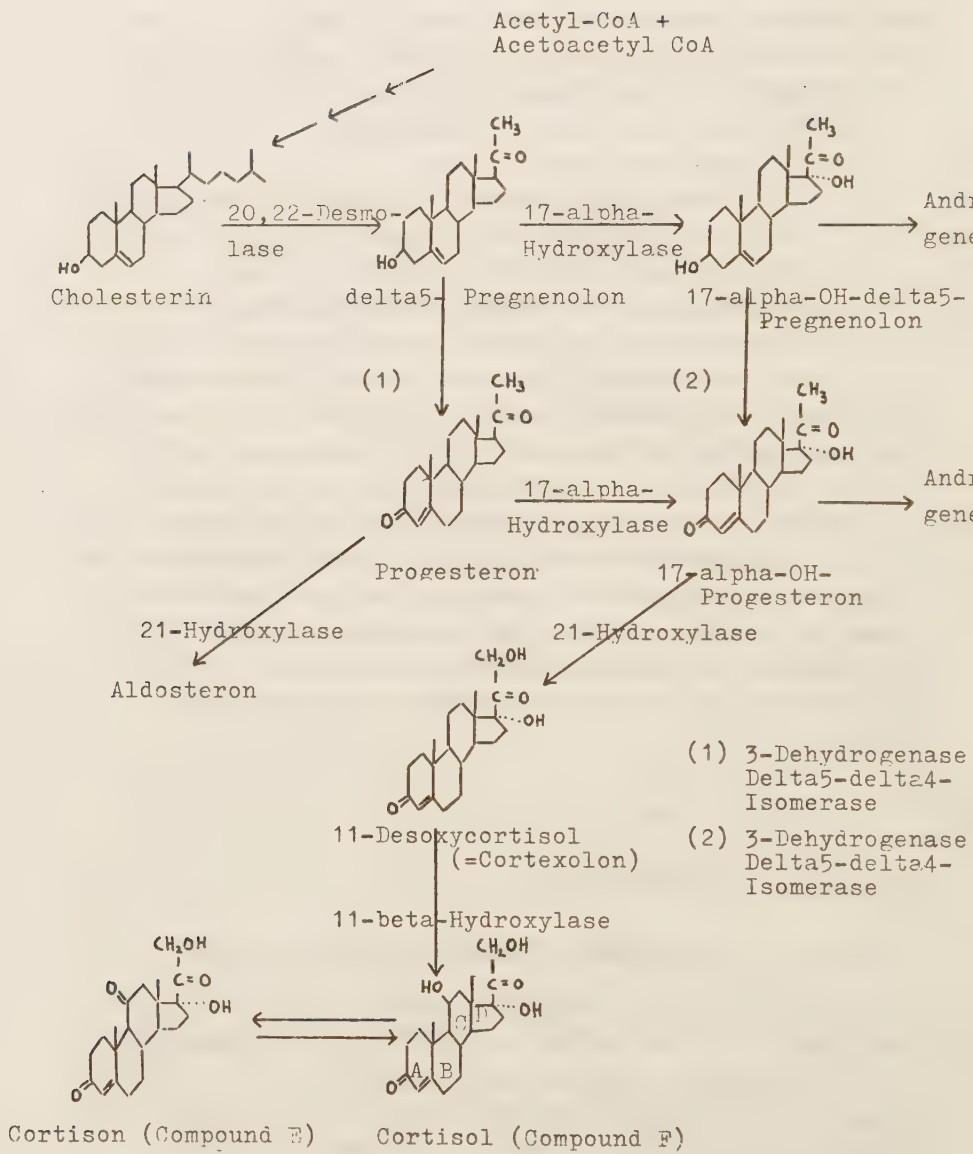


Abb. 1: Schema der Biosynthese des Cortisols

Cortisol wird im Blut überwiegend an ein spezifisches Transportprotein, das Transcortin, gebunden. Nur ein kleiner Teil (ca. 10-20 %) (50) zirkuliert als freies Hormon und ist biologisch wirksam (54).

Biosynthese und Sekretion des Cortisols in der Nebennierenrinde werden durch Hypothalamus und Hypophyse mit Hilfe des Corticotropin-releasing-factors (CRF) bzw. des adrenokortikotropen Hormons (ACTH) kontrolliert (22, 34), die ihrerseits einer negativen Feedback-Kontrolle durch das zirkulierende Cortisol unterliegen. In Ruhe oder bei leichter körperlicher Tätigkeit besteht ein deutlicher Schlaf-Wach-Rhythmus mit einem Maximum am Morgen und einem Minimum am Abend (24). Sinkt der Cortisolspiegel (Regelgrösse) im Plasma durch geringe Produktion der NNR (=Stellglied) oder durch zu raschen Abbau unter den Sollwert des vorgegebenen Programms, wird solange vermehrt CRF vom Hypothalamus (Fühler und Programmregler) sezerniert, bis über die erhöhte ACTH-Produktion die IST-Konzentration wieder dem Sollwert entspricht (Abb.2).

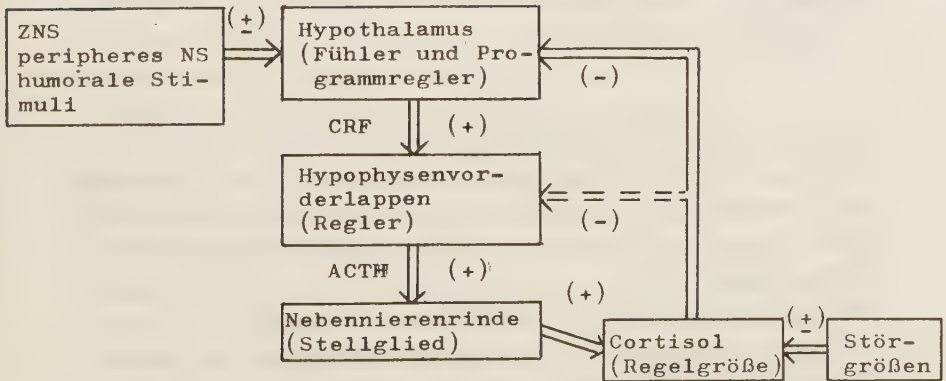


Abb. 2: Regelkreisschema der Cortisolsekretion

Aus diesem Regelkreisschema lassen sich die in der Einleitung bereits erwähnten Funktionsteste, der Suppressions-test mit Dexamethason und der Stimulationstest mit Synacthen^R ableiten: durch exogen zugeführtes Dexamethason, ein synthetisches Glucocortikoid, wird die Ausschüttung von CRF des Hypothalamus und die ACTH-Sekretion des Hypophysenvorderlappens sehr viel stärker gehemmt als durch Cortisol. Durch die verminderte ACTH-Sekretion nimmt beim Gesunden die Cortisolproduktion der NNR ab, was als Abnahme im Blutspiegel zu erkennen ist.

Die Zufuhr des ACTH-Analogons Synacthen^R stimuliert die Nebennierenrinde zu einer vermehrten Cortisolproduktion mit einem entsprechenden Anstieg der Cortisolkonzentration im Blut.

Die grösste Rolle im Steroidmetabolismus spielt die Leber, wo die Nebennierensteroidoide hydriert und mit Glucuronsäure oder Schwefelsäure konjugiert werden. Dadurch werden sie wasserlöslich. Hauptausscheidungsorgan ist die Niere. Neben den inaktiven Konjugaten gelangt nur eine sehr kleine Menge biologisch aktiven Cortisols in den Urin.

2.2. Methoden zur Bestimmung von Cortisol

Die in der Literatur angegebenen Methoden zur Bestimmung von Cortisol sind so zahlreich, dass an dieser Stelle nur eine Auswahl der gebräuchlichsten Verfahren angeführt werden kann.

PORTER und SILBER (45) beschrieben 1950 eine Reaktion, die alle 17-hydroxylierten Corticosteroide vom Typ des Cortisols mit Phenylhydrazin in schwefelsaurer Lösung in einer photometrisch bestimmbaren Farbumsetzung geben (30). Bestimmte NNR-Steroide werden dabei nicht erfasst, so z.B. das Corticosteron und das Aldosteron.

Im Urin liegen die 17-hydroxylierten Metaboliten als wasserlösliche Konjugate vor, deren Spaltung mit saurer oder enzymatischer Hydrolyse erfolgen kann (57). Die abgespaltenen Steroide werden mit Chloroform extrahiert, gereinigt und kolorimetrisch bestimmt. Die gleichzeitige Extraktion eines nicht hydrolysierten Urinanteils erlaubt die Unterscheidung zwischen freien und konjugierten 17-Hydroycortikosteroiden (17-OHCS, PORTER-SILBER-Chromogene). Die Zuverlässigkeit der Methode ist durch die geringe Spezifität von Farbreaktionen bei Gruppenbestimmungen beeinträchtigt. Die Tatsache, dass nicht alle Corticosteroide und deren Abbauprodukte erfasst werden, schränkt die Aussagefähigkeit des Verfahrens stark ein (55). Verschiedene Modifikationen, wie die direkte Extraktion der Glucuronide aus dem Urin (47) und die weitere Reinigung der Urinextrakte über eine Florisilsäule (19) brachten nicht die erhoffte Verbesserung der Spezifität.

Um die umständliche und bei Kindern oft nicht exakt durchführbare Sammlung eines 24-h-Urins zu sparen, wurden die PORTER-SILBER-Chromogene nach dem oben beschriebenen Prinzip in modifizierter Form (5) auch im Plasma bestimmt. Die notwendige Spezifität liess sich nur durch komplizierte Vorreinigung des Cortisols aus dem Plasmaextrakt erreichen. Die Richtigkeit der Methode wurde durch nicht beeinflussbare Konzentrationschwankungen und Mitreaktionen anderer Steroide und unspezifischer Chromogene beeinträchtigt (32).

Auch fluorometrische Methoden zur Bestimmung von Cortisol wurden beschrieben. Dazu musste der Serumextrakt von störenden Substanzen weitgehend befreit werden. Ein Äthanol-Schwefelsäuregemisch diente als Fluoreszenzreagenz.

Präzision, Reproduzierbarkeit und Empfindlichkeit sind je nach angewandter Methode verschieden hoch (26,51,56). Die Untersuchung der Spezifität einiger fluorometrischer Cortisolbestimmungsverfahren (21,44) ergab als die wichtigsten unspezifischen Fluorogene das Corticosteron und das freie Cholestrin, neben vielen anderen unspezifischen Störfaktoren wie z.B. Siliconfette, Gummi oder dessen Weichmacher und Detergentien (32). Auch Medikamente, wie z.B. Aldactone führen zu Störungen (58,67). Der Vergleich der Normbereiche für verschiedene Modifikationen zeigt sehr unterschiedliche Werte (12,18,21). Die mit den spezifischen, aber sehr aufwendigen Doppelisotopen-Methoden (52) ermittelten Referenzwerte liegen niedriger als die fluorometrisch bestimmten. Man erhält also durch die fluorometrische Cortisolbestimmung im Serum zu hohe Werte.

Ein grosser Fortschritt in der Analytik der Steroide wurde durch die Einführung der kompetitiven Proteinbindungstechnik erzielt (36).

Hierunter versteht man die Konkurrenz radioaktiver und nicht radioaktiver Moleküle einer Substanz um eine begrenzte Zahl von Bindungsstellen an einem Protein. Die Bindung unterliegt dem Massenwirkungsgesetz. Das Verhältnis von radioaktiv markierten und nicht markierten Molekülen am Protein entspricht dem Verhältnis ihrer Konzentrationen im Versuchsansatz. Hält man die Konzentrationen von bindendem Protein und radioaktiven Molekülen konstant, so werden um so weniger radioaktive Moleküle vom Protein gebunden, je mehr nicht radioaktive dem Ansatz hinzugegeben werden. Zur Messung der proteingebundenen Radioaktivität ist die Trennung der freien von den gebundenen Molekülen notwendig. Dies lässt sich bei den Steroiden leicht erreichen, z.B. durch Adsorption der

freien Steroidmoleküle an Kohle und anschliessende Zentrifugation. Die Radioaktivität im Überstand repräsentiert den proteingebundenen Anteil des radioaktiven Steroids. Durch den Vergleich mit Ansätzen, die definierte Mengen des nicht radioaktiven Steroids enthalten, lässt sich die Menge dieses Hormons in den Proben ermitteln (36).

Eine wesentliche Voraussetzung für die Brauchbarkeit eines Proteins zur Bindungsanalyse ist seine Affinität zu der Substanz, die gemessen werden soll. Sie beeinflusst direkt die Empfindlichkeit der Standardkurve und des Assays (2). Hohe Affinität bewirkt hohe Empfindlichkeit und geringe Störanfälligkeit. Von entscheidender Bedeutung ist ausserdem die Spezifität, mit der das Protein einen bestimmten Liganden unter vielen ähnlichen zu erkennen und zu binden vermag. Je höher die Spezifität ist, umso geringer ist die Mühe, die auf die Isolierung und Reinigung der zu bestimmenden Substanz aus dem Untersuchungsmaterial verwendet werden muss.

Als spezifisch Cortisol-bindendes Protein dient in der von MURPHY (36) erstmals beschriebenen Methode das Plasmaprotein "Transcortin". Es hat gegenüber Cortisol eine Bindungsaffinität von etwa 6×10^8 l/Mol bei 4°C (7). Da die zur Trennung der freien von den Transcortin-gebundenen Cortisolmolekülen verwendeten Adsorbentien, Florisil oder Kohle eine nur wenig geringere Affinität zu Cortisol besitzen als das Transcortin, konnten sie durch Ablösen des Cortisols vom Transcortin das Bindungsgleichgewicht stören. Zur Vermeidung derartiger Störungen war die strikte Einhaltung standardisierter Bedingungen besonders wichtig.

Ein weiterer Nachteil ist die geringe Spezifität des Transcortins. Neben Cortisol bindet es auch andere Steroide wie z.B. Corticosteron, 17-Hydroxyprogesteron

und Progesteron. Diese Unspezifität kann besonders stark zum Tragen kommen beim kongenitalen adrenogenitalen Syndrom (AGS), mit seinen hohen Konzentrationen an 17-OH-Progesteron, Androgenen und anderen Steroiden, und während der Schwangerschaft mit ihren erhöhten Progesteronspiegeln.

Mit der Einführung des Radioimmunoassays (RIA) in die biochemische Analytik war eine Methode gefunden, die die hohe Empfindlichkeit radiochemischer Methoden mit der hohen Spezifität immunologischer Methoden verknüpft.

Nachdem bereits seit 1959 Proteo- und Polypeptidhormone (60) im Radioimmunoassay sehr genau gemessen werden konnten, beschrieb 1969 erstmals ABRAHAM (1) einen Radioimmunoassay zum Nachweis eines Steroidhormons, des 17-beta-Östradiols, im Plasma.

Inzwischen sind für nahezu jedes bekannte Steroidhormon und für viele andere Steroide ohne bekannte biologische Aktivität radioimmunologische Nachweisverfahren entwickelt worden (2).

Auch für Cortisol sind verschiedene Methoden beschrieben, die auf dem Prinzip der kompetitiven Proteinbindung unter Verwendung von Antikörpern als spezifisch Cortisol-bindenden Proteinen beruhen (13,17,43,49).

Die Vorteile des Radioimmunoassays gegenüber der kompetitiven Proteinbindung mit Transcortin als bindendem Agens sind die um ein bis zwei Zehnerpotenzen höhere Affinität, die allgemeinere Anwendbarkeit und die grössere Spezifität der Antikörper.

Da auch Antiseren nie absolut spezifisch sind, d.h. ohne jede Kreuzreaktivität zu anderen Substanzen als zu der gewünschten, wurde die Spezifität des Radioimmunoassays von Steroiden durch Extraktion und

chromatographische Reinigung zu verbessern versucht (43,49). Mit der Produktion zunehmend spezifischerer Antiseren wurde es aber schliesslich möglich, Cortisol direkt im Plasma oder Serum, ohne vorherige Extraktion, zu bestimmen (13,17). Da die Plasma-Spiegel des Cortisols im allgemeinen um mindestens eine Zehnerpotenz höher liegen als die der anderen Steroide, wirken sich geringe Unspezifitäten auf die Bestimmung dieses Hormons nicht so erheblich aus. Die direkte Bestimmung bedeutet eine Steigerung der Praktikabilität der Methode.

Nicht jedes Antiserum genügt den gestellten Anforderungen hierfür. Die gewonnenen Anti-Seren müssen deshalb durch Kreuzreaktionsprüfungen sehr genau getestet werden, bevor sie als analytisches Reagenz eingesetzt werden. Je geringer die Spezifität ist, desto höhere Werte werden gefunden.

Auf Grund der Stabilität der Antiseren kann mit ihnen jahrelang gearbeitet werden.

Durch Verwendung von Antiseren wird eine sehr viel grössere Konstanz der Eigenschaften des spezifisch Cortisol-bindenden Proteins garantiert als durch das Transcortin.

3. Methodik

3.1. Material

3.1.1. Reagenzien

- (1) L-Glutaminsäure ($C_5H_9NO_4$)
Merck, Darmstadt
- (2) di-Natriumhydrogenphosphat-2-hydrat
($Na_2 HPO_4 \cdot 2 H_2O$)
Merck, Darmstadt
- (3) Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)
Merck, Darmstadt
- (4) Natriumazid (NaN_3)
Merck, Darmstadt
- (5) Äthanol absolut p.a.
Merck, Darmstadt
- (6) Dioxan reinst
Merck, Darmstadt
- (7) Naphthalin für Szintillationsmessungen
Merck, Darmstadt
- (8) PPO (2,5-Diphenyloxazole)
Koch-Light Laboratories Ltd., England
- (9) Hydrocortison für biochemische Zwecke
Merck, Darmstadt
- (10) 17-alpha-Hydroxyprogesteron
Merck, Darmstadt

- (11) (1,2,6,7 (n)-³H)-Cortisol
68 Ci/mmol
Amersham Buchler, Braunschweig
- (12) Gamma-Globulin vom Rind, trocken, reinst
Behringwerke, Marburg
- (13) Dextran T 70
Pharmacia Uppsala, Schweden
- (14) Norit A pract.
Serva, Heidelberg
- (15) Aqua destillata, steril, p.i., DAB 7
Braun-Melsungen
- (16) Moni-trol 1
Merz & Dade GmbH., München
- (17) Cortisol-Antiseren (AK 62 und AK 127)
Endokrinolog. Labor, Univ.Kinderklinik,
München

3.1.2. Lösungen

- (1) Phosphatpuffer, pH 7.6, 0,1 mol/Liter
KH₂PO₄ : 1,769 g
Na₂HPO₄ : 15,485 g
NaN₃ : 0,325 g
Aqua dest. ad 1000 ml
Haltbar für mindestens 6 Monate bei 4°C.

- (2) Glutamatpuffer, pH 3,3, 0,033 mol/Liter
L-Glutaminsäure: 1,2 g
 NaN_3 : 0,054 g
Aqua dest. ad. 200 ml
Haltbar für mindestens 6 Monate bei 4°C.
- (3) Lösung zur Verdünnung der Cortisolstandards
100 ml aus Lösung 1 (Phosphatpuffer)
Gammaglobulin vom Rind: 1 g
 NaN_3 : 0,325 g
Aqua dest. ad 1000 ml
Haltbar für mindestens 3 Monate bei 4°C.
- (4) Gamma-Globulin-Phosphatpuffer, pH 7,2
 KH_2PO_4 : 2,686 g
 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 8,356 g
 NaN_3 : 0,325 g
Gammaglobulin vom Rind: 1,0 g
Aqua dest. ad 1000 ml
- (5) Kohle-Dextran-Lösung
Dextran T 70 : 50 mg
Norit A : 500 mg
Gamma-Globulin-Phosphatpuffer (Lösung 4)
ad 100 ml
Haltbar für mindestens 1 Woche bei 4°C.
- (6) Szintillator-Lösung
Naphthalin : 250,0 g
PPO : 17,5 g
POPOP : 0,75 g
In 2500 ml Dioxan lösen.

- (7) Cortisol Stammlösung
Cortisol: 50mg
Äthanol absolut p.a.: ad 50 ml
- (8) 17-alpha-OH-Progesteron-Stammlösung
17-alpha-OH-Progesteron: 50 mg
Äthanol absolut p.a. : ad 50 ml
- (9) ^3H -Cortisol Arbeitsisotopenlösung
Das Lösungsmittel des Reagens Nr. 11 wird in einer Stickstoffatmosphäre abgedampft. Der Rückstand wird mit Lösung Nr. 1 verdünnt bis eine Zählrate um 15000 cpm pro 0,1 ml Lösung erreicht ist.
- (10) Antikörperlösung
Das Antiserum AK 127 wird entsprechend seiner Antikörperkonzentration mit Lösung Nr. 1 auf 1:5000 verdünnt (Verdünnungsreihe 1).
Die Verdünnung wurde so gewählt, dass von den 15000 cpm (ca. 60 pg) ^3H -Cortisol-Arbeitsisotopen-Lösung (Lösung 9) etwa 50 % durch 0,5 ml Antikörperverdünnung gebunden werden.

3.1.3 Geräte

- (1) Liquid-Szintillation-Spektrometer BF 5000
Berthold-Friesecke, Karlsruhe
- (2) Elektronenrechner
Diehl algotronic, Nürnberg

- (3) Tri-Carb, Modell 3320
Liquid-Szintillation-Spektrometer
Packard Instruments, Frankfurt
- (4) Kühlzentrifuge
Roto Silenta K
Hettich, Tuttlingen
- (5) Tischzentrifuge 3200
Eppendorf, Hamburg
- (6) Thermoblock T 34
Wissenschaftlich technische Werkstätten,
Weilheim
- (7) Wärmeofen Heraeus TA 500
Heraeus GmbH., Hanau

Alle bei Probenvorbereitung und Assay verwendeten Glasgeräte werden vor Gebrauch mit Methanol gespült und bei 500°C ausgeheizt, um verunreinigende Steroide zu zerstören (27).

3.2. Versuchsablauf

3.2.1. Vorbereitung und Enteiweissung der Proben

Die Einmal-Glasröhrchen (Grösse 75 x 14 mm) werden vor Versuchsbeginn durchnummeriert :

Röhrchen Nummer 1 wird durch den gesamten Assay als Kontrolle der im Radioimmunoassay verwendeten Gesamtradioaktivität geführt und wird im Gegensatz zu Standards und Proben nicht mit Holzkohle beschickt. Die Röhrchen 2 bis 8 sind für die Cortisolstandards vorgesehen, mit Konzentrationen von 0, 50, 100, 200, 300, 400 und 500 ug Cortisol pro Liter. Zur Cortisolmessung im Plasma stehen die Röhrchen ab Nr. 9 zur Verfügung.

In jedes der Röhrchen wird mit einer Eppendorfpipette 0,2 ml Glutamatpuffer (Lösung 2) gegeben. Dazu pipettiert man mit Kapillarpipetten in die Röhrchen Nr. 1 und Nr. 2 (Nullwert) jeweils 10 ul Puffer (Lösung 3), in die Röhrchen 3 bis 8 je 10 ul der Cortisolstandards von 50 bis 500 ug/l, und ab Nr. 9 jeweils 10 ul der Plasmaproben. Jedes Röhrchen wird einzeln mit Kunststoffolie (Parafilm^R) fest verschlossen. Nach kurzem Schütteln wird der Ständer mit den Röhrchen für 15 Minuten in ein kochendes Wasserbad gestellt.

Nach dem Kochen werden die Röhrchen abgekühlt, geöffnet und mit je 0,2 ml Phosphatpuffer (Lösung 1) von pH 3.3 auf pH 6.9 umgepuffert.

Der Arbeitsgang der Probenvorbereitung und Enteiweissung ist in Abb. 3 a schematisch zusammengefasst.

3.2.2. Radioimmunologische Messung

Aus den abgekühlten Ansätzen wird mit der Eppendorf-pipette je 0,1 ml Lösung entnommen und in entsprechend beschriftete Glasröhrchen (Grösse 75 x 10 mm) pipettiert. Dazu gibt man je 15000 cpm des Tritium-markierten Cortisols in 0,1 ml Puffer (Lösung 9) und je 0,5 ml der Antiserumverdünnung (Lösung 10).

Die Röhrchen werden gut gemischt, mit Alu-Folie abgedeckt und für 2 Stunden im Eiswasser inkubiert.

Zur Trennung des freien Cortisols vom Antikörpergebundenen Cortisol wird in jeden Ansatz, mit Ausnahme des Röhrchens Nr. 1 0,5 ml Dextran-Holzkohle in kaltem Puffer (Lösung 5) gegeben. In das Röhrchen Nr. 1 wird an Stelle der Kohle 0,3 ml Phosphatpuffer (Lösung 1) gegeben. Alle Ansätze werden zusammen im Reagenzglasständer durch Schütteln gut gemischt, abgedeckt und für 10 Minuten im Eiswasser inkubiert. Anschliessend werden die Röhrchen in der Kühlzentrifuge bei 4°C und ca. 1700 x g 10 Minuten lang zentrifugiert. Die Überstände werden in Polyäthylen-Zählröhrchen dekantiert, in denen sich je 10 ml Szintillationsflüssigkeit (Lösung 6) befinden. Die Zählröhrchen werden verschlossen, gut gemischt und in einen Szintillations-Spektrometer gestellt. Es wird jeweils die Zeit, die zur Akkumulation von 20000 counts benötigt wird, gemessen. Dadurch wird der Zählfehler konstant auf $\pm 1,4\%$ gehalten.

Der Arbeitsgang der radioimmunologischen Messung ist in Abb. 3 b schematisch zusammengefasst.

Die Auswertung erfolgt durch Auftragen der Standardkonzentrationen gegen die Zählzeiten, die zum Erreichen von 20000 counts benötigt werden.

Eine typische Eichkurve ist in Abbildung 4 dargestellt; angegeben sind Mittelwert und Streubereich aus Dreifachbestimmungen.

Aus den Zählzeiten der zu bestimmenden Ansätze lassen sich aus der Eichkurve heraus die gesuchten Konzentrationen direkt auf der Abszisse ablesen.

Abb. 3: Schema des Arbeitsganges

a: <u>Vorbereitung und Enteiweissung der Proben</u>			
Zugabe von: (alle Angaben in ml)	Röhrchennummer		
	1	2 - 8	9 u. folgende
	Gesamtradioaktivität	Standards	Plasma-proben
Glutamatpuffer (Lösung 2)	0,2	0,2	0,2
Phosphatpuffer (Lösung 1)	0,01	-	-
Standards	-	0,01 ^x	-
Plasma-Probe	-	-	0,01
Inkubation im kochenden Wasserbad für 15 Minuten			
Phosphatpuffer (Lösung 1)	0,2	0,2	0,2
^x : Die Standards enthalten folgende Cortisolkonzentrationen: 0, 50, 100, 200, 300, 400 und 500 ug/l			
b: <u>Radioimmunoassay</u>			
Entnahme aus den enteiweisssten Proben	0,1	0,1	0,1
Zugabe von:			
³ H-Cortisol (Lösung 9)	0,1	0,1	0,1
Antikörperlösung (Lösung 10)	0,5	0,5	0,5
Mischen und Inkubation im Eiswasserbad für 2 Stunden			
Phosphatpuffer (Lösung 1)	0,3	-	-
Kohle-Dextran-lösung (Lösung 5)	-	0,5	0,5
Mischen und Inkubation bei 0°C für 10 Minuten			
Zentrifugation bei 4°C und 1700 x g für 10 Minuten			
Überstand in Polyäthylenzählröhrchen dekantieren, die je 10 ml Szintillatorlösung (Lösung 6) enthalten; den Rest verwerfen.			
Liquidszintillations-Spektrometer: Messung der Zeit, die zum Erreichen von 20000 counts pro Ansatz benötigt wird.			

Zählzeit
(Min./20000 counts)

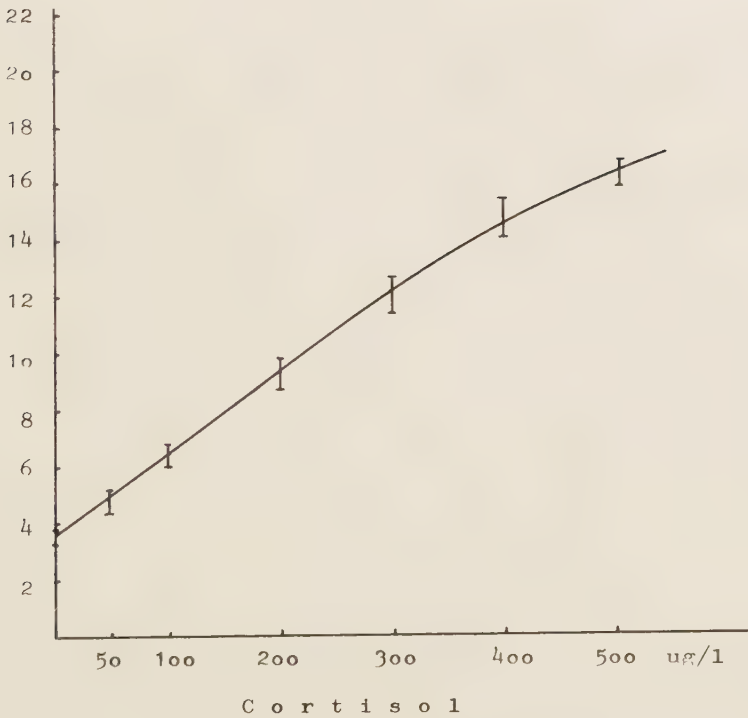


Abb. 4: Typisches Beispiel einer Eichkurve:
angegeben sind Mittelwert und Streubereich von
Dreifachbestimmungen

3.3. Vorversuche zur Optimierung des Versuchsablaufes

Zur Optimierung des beschriebenen Radioimmunoassays wurden zahlreiche Versuche durchgeführt, die im folgenden besprochen werden.

3.3.1. Volumen- und Konzentrationsänderungen durch den Kochvorgang

Die Gleichbehandlung aller Ansätze im Assay muss während des 15-minütigen Erhitzens der Proben im kochenden Wasserbad gewährleistet sein. Es sind zwei Möglichkeiten denkbar, die diesen Grundsatz verletzen könnten: stehen die Reagenzröhrchen unverschlossen im Wasserbad, so kann es zum einen durch überkochendes Wasser, zum anderen durch ungleiche Verdampfungsverluste, abhängig vom Standort der Proben, zu Volumen- und damit auch zu Konzentrationsveränderungen in einzelnen Ansätzen kommen.

Um solche beim Kochvorgang eventuell auftretenden Störungen zu erfassen, werden drei Versuchsreihen mit je 24 Ansätzen gebildet. In jeden Ansatz werden 0,2 ml Glutamatpuffer und 0,1 ml ^3H -Cortisol in Puffer (ca. 15000 cpm) pipettiert.

Die Proben der ersten Versuchsreihe werden einzeln mit Kunststoffolie (Parafilm^R) abgedeckt. Dabei wird beachtet, dass der Parafilm^R nicht über der Röhrchenöffnung spannt, da er sonst bei einigen Röhrchen durch den Dampfdruck, der sich in den Glasröhrchen während des Kochens entwickelt, aufplatzt und die angestrebte Gleichbehandlung der Ansätze nicht gewährleistet wäre.

Die Proben der zweiten Versuchsreihe werden nicht abgedeckt. Es wird aber sorgfältig darauf geachtet, dass kein Wasser in die offenen Röhrchen überkochen kann.

Die Proben der dritten Versuchsreihe werden nicht gekocht, sondern nur gut gemischt.

Die ersten beiden Versuchsreihen werden im gleichen Wasserbad 15 Minuten lang gekocht und anschliessend bei Zimmertemperatur abgekühlt.

Beim Abziehen des Parafilms von den verschlossenen Proben (Versuchsreihe 1) wird an der Membran kondensierte Flüssigkeit am Gläschenrand sorgfältig abgestreift.

Aus den Ansätzen der drei Versuchsreihen werden mit einer Eppendorf-Pipette jeweils 0,1 ml Lösung entnommen, in Polyäthylenzählröhrchen gegeben, die 10 ml Szintillationsflüssigkeit (Lösung 6) enthalten, und in einem Liquid-Szintillations-Spektrometer die Impulse pro Minute (cpm) bestimmt. Die gemessenen Werte sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Tabelle 1 : Volumen- und Konzentrations-
Änderungen durch den Kochvorgang

Versuchsreihe 1 Versuchsreihe 2 Versuchsreihe 3			
mit Parafilm abgedeckt 15 Min.ge- kocht		nicht abge- deckt 15 Min.ge- kocht	nicht gekocht
alle Werte in counts per Minute (cpm)			
5555	6262	4982	
5392	6866	4776	
5534	5807	5211	
5554	5634	5082	
5786	6768	5185	
5613	7187	4784	
5659	6649	5204	
5666	5979	5564	
5163	5496	5407	
5155	5882	4909	
5472	5805	4971	
6033	4580	5050	
5561	5528	4692	
5128	7656	5216	
5632	6437	5208	
5635	5658	5039	
4951	6013	5521	
4388	6238	4719	
5354	6899	5132	
5133	6181	5303	
5212	5978	4976	
5296	7554	5423	
5264	7747	5351	
5211	5604	5076	
Mittel- wert $\bar{x}$	5385	6267	5120
Standard- abweichung: s	325	759	248
Variations- koeffi- zient: VK	6 %	12,1 %	4,8 %

Der Mittelwert der Zählraten in den gekochten und verschlossenen Proben (Versuchsreihe 1) unterscheidet sich vom Mittelwert der nicht gekochten Proben in der Versuchsreihe 3 um 5,2 %. Die Variationskoeffizienten beider Reihen unterscheiden sich mit 6,0 % gegen 4,8 % nur geringgradig.

Dagegen unterscheiden sich die Mittelwerte der Zählraten in der Versuchsreihe mit den gekochten, nicht abgedeckten Röhrchen (Versuchsreihe 2) und den nicht gekochten Röhrchen (Versuchsreihe 3) um 22,4 %. Der Variationskoeffizient der 2. Versuchsreihe liegt bei 12,1 % und ist damit doppelt so gross wie in der Versuchsreihe 1 und 2,5-fach grösser als in Reihe 3. Die Wasserverluste in der Versuchsreihe 2 durch Verdampfen sind erheblich und ungleichmässig. Der grosse Variationskoeffizient zeigt, dass es in den offenen Röhrchen nicht möglich ist, gleiche Versuchsbedingungen zu erhalten.

Versuchsreihe 1 weist zwar auch Flüssigkeitsverluste von ca. 5 % auf, der Variationskoeffizient ist aber nur um 1,2 % grösser als bei der nicht gekochten Versuchsreihe. Die Gleichbehandlung aller Ansätze lässt sich also durch Abdecken der Proben und Standards vor dem Kochvorgang zufriedenstellend gewährleisten.

3.3.2. Denaturierung der Cortisol- bindenden Proteine

Im Radioimmunoassay lässt sich nur das freie, nicht an Trägerproteine gebundene Cortisol bestimmen.

Im Plasma ist Cortisol aber zu etwa 80 - 90 % (50) an Transportproteine, wie Transcortin und Albumin

gebunden. Um das Plasma-Cortisol messen zu können, müssen die Transportproteine durch Extraktion oder Denaturierung soweit verändert werden, dass sie ihre Bindungsfähigkeit für Cortisol verlieren. Die Denaturierung lässt sich durch den Kochvorgang erreichen. Voraussetzung ist allerdings, dass Cortisol selbst unter den gewählten Bedingungen hitzebeständig ist und auch nicht vom denaturierten Protein unspezifisch adsorbiert wird. Werden Plasmen in Glutamatpuffer pH 3,3 (14,58) oder in Lysinpuffer pH 10,5 (15) auf geeignete Konzentrationen verdünnt, werden die Plasmaproteine durch Hitze denaturiert, fallen aber nicht aus.

Im vorliegenden Versuch wird mit einem Einsatz von 10 μ l Plasma in 0,2 ml Glutamatpuffer pH 3,3 (Lösung 2) gearbeitet. Bei Verwendung der doppelten Plasmamenge konnten wir eine feinflockige Proteinausfällung beobachten, die möglicherweise zu Bestimmungstörungen führen könnte.

Die Vollständigkeit der Denaturierung der Plasmaproteine wird überprüft anhand der Unfähigkeit der Plasmen nach der Erhitzung noch Cortisol binden zu können. Zu diesem Zweck werden zu jeweils 0,2 ml Glutamatpuffer in 8 Ansätze 10 μ l Phosphatpuffer und in weitere 15 Ansätze 10 μ l verschiedener Plasmen gegeben und 15 Minuten lang gekocht. Nach Abkühlen wird zu jedem Ansatz 0,1 ml ^3H -Cortisol (ca. 14000 cpm) und 0,5 ml Phosphatpuffer (Lösung 1) gegeben. Nach zweistündiger Inkubation in Eiswasser werden die freien, nicht gebundenen Cortisolmoleküle mit 0,5 ml Dextran-beschichteter Holzkohle abgetrennt und die Radioaktivität des Überstandes im Liquid-Szintillations-Spektrometer

gemessen. Liegen die Zählraten im Überstand der 15 gekochten Plasmaproben nennenswert über dem Mittelwert der 8 Pufferansätze, so würde das bedeuten, dass die Plasmen auch nach 15-minütigem Erhitzen im kochenden Wasserbad markiertes Cortisol binden können. Die gemessenen Werte sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Tabelle 2 : Auswirkung des Kochens auf die
Bindungsfähigkeit der Plasma-
proteine für Cortisol

Zugegebene Aktivität pro Ansatz: 13 949 cpm = 100 %			
Nach Kohle/Dextran Adsorption im Überstand verbliebene Aktivität		Prozent der zuge- gebenen Aktivität:	
cpm		%	
Puffer allein:			
n = 8;	$\bar{x}$ =	145	1.0
Verschiedene Plasmen			
n = 15;	178		1.3
	131		0.9
	171		1.3
	113		0.8
	138		0.9
	129		0.9
	150		1.1
	203		1.5
	140		1.0
	233		1.7
	142		1.0
	176		1.3
	141		1.0
	224		1.6
	229		1.6
Mittelwert der Plasmaeinsätze: $\bar{x}$ =		166	im Mittel 1.2

Die Mittelwerte der ^3H -Cortisol-Mengen in den Ansätzen mit denaturiertem Plasma unterscheiden sich nur um 0,2 % von denen mit Puffereinsatz. Daraus lässt sich schliessen, dass die Plasmaproteine ihre Bindungsfähigkeit für Cortisol durch Erhitzen auf 100°C völlig verloren haben. Dieses Ergebnis steht in Übereinstimmung mit den Untersuchungen von DAUGHADAY et al (10), die feststellten, dass das Corticosteroid-bindende Globulin im menschlichen Plasma durch 20-minütiges Erhitzen auf 60°C vollständig inaktiviert wird. Auch FOSTER und DUNN (17) zeigten, dass in Seren die Cortisol-bindenden Proteine durch 15-minütiges Kochen soweit denaturiert werden, dass sie ihre Bindungsfähigkeit für Cortisol verlieren.

3.3.3. Hitzestabilität von Cortisol

Zur Klärung der Frage, ob Cortisol, im Gegensatz zu seinen Bindungsproteinen, in der im Versuch benützten Verdünnung in Glutamatpuffer pH 3.3 und dem anschliessenden 15-minütigen Kochen unverändert bleibt, dient folgender Versuch:

Die Cortisolstandardwerte 50, 100, 200, 300, und 400 $\mu\text{g/l}$ werden einmal zu Glutamatpuffer gegeben und im kochenden Wasserbad 15 Minuten erhitzt, zum anderen erst nach dem Erhitzen des Glutamatpuffers allein in die Reagenzröhrchen pipettiert. Die gekochten und die nicht gekochten Standards werden entsprechend dem im Radioimmunoassay beschriebenen Versuchsablauf (S.18) weitergeführt.

Die Übereinstimmung der aus je 8 Ansätzen gewonnenen Mittelwerte der gekochten und der nicht gekochten Standardkonzentrationen geht aus Abb. 5 und Tabelle 3 hervor.

Es ergibt sich ein mittlerer Konzentrationsunterschied von ca. 5%. Dieser geringgradige Verlust kann im Assay vernachlässigt werden, da nicht nur die Proben sondern auch die Standards gekocht wurden. Veränderungen der Cortisolkonzentrationen, die durch das Kochen der Proben entstehen könnten, würden durch die Gleichbehandlung der Standards ausgeglichen.

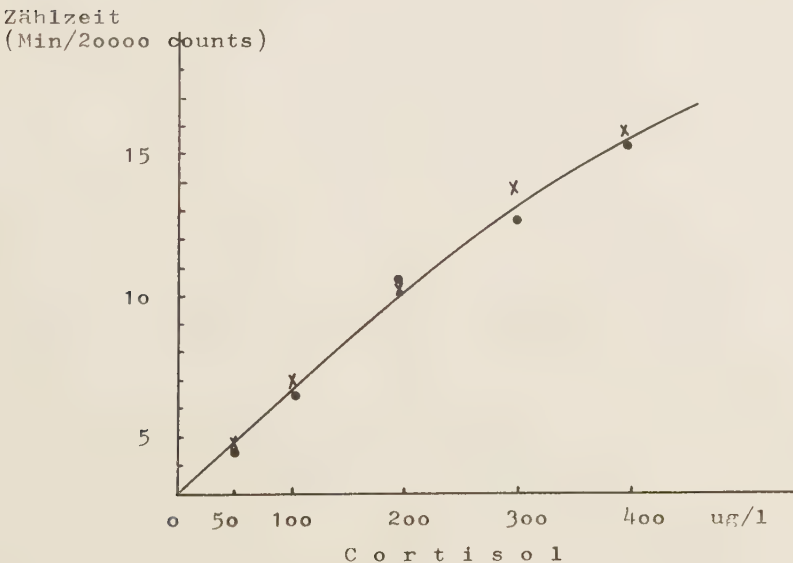


Abb. 5: Cortisolstandards:

x = ohne Kochen der Standardlösung

• = nach Kochen der Standardlösung

Jeder Punkt bildet den Mittelwert aus 8 Bestimmungen (Tabelle 3).

Tabelle 3: Auswirkung des Kochens auf die
Stabilität des Cortisols

Cortisolkonz. (ug/l)	Zeit zum Erreichen von 20 000 counts (Min)		% von t_1
	t_1 nicht ge- kocht	t_2 gekocht	
50	4.76	4.5	94,5
100	6.8	6.35	93.4
200	10.37	10.46	100.9
300	13.7	12.6	92
400	15.92	15.15	95.2

3.4. Das Antiserum

3.4.1. Titerhöhe des Antiserums AK 127

Als bindendes Agens wurde das Antiserum AK 127 verwendet. Es wurde durch Immunisation von Kaninchen mit Cortison- C_{21} -Hemisuccinat-Rinderalbumin-Konjugat gewonnen und ohne besondere Präparation oder Anreicherung der Antikörper benützt. In Gamma-Globulinhaltiger Phosphatpufferlösung (Lösung 3) bei $4^{\circ}C$ aufbewahrt, ist es mindestens 4 Wochen stabil, so dass in diesem Zeitraum mit konstanten Eigenschaften der Antikörperlösungen gerechnet werden kann.

Um den Test auf hohe Empfindlichkeit einzustellen, muss das Antiserum entsprechend seiner Antikörperkonzentration verdünnt werden. Entsprechend einer allgemeinen Erfahrung wird die Antiserumverdünnung gewählt, bei der das im Test verwendete 3H -Cortisol zu etwa 50 % an die Antikörper gebunden wird. (1) Eine zu geringe Verdünnung, die eine grössere Bindung als 50 % bewirkt, führt zu einer flacheren, weniger empfindlichen Eichkurve. Eine zu hohe Verdünnung ergibt eine steile, sehr empfindliche Eichkurve, die jedoch nur kurz und daher nur für einen kleinen Konzentrationsbereich ohne Verdünnung der Probe anwendbar ist.

Zur Ermittlung der für den Test am besten geeigneten Verdünnung wird das Antiserum AK 127 mit Puffer (Lösung 3) von 1:5000 bis 1:40000 verdünnt (Verdünnungsreihe 1). Jede Verdünnungsstufe wird entsprechend dem Vorgehen beim Radioimmunoassay (RIA) mit ca. 15000 cpm inkubiert. Die Verdünnung, bei der 50 % des vorgelegten 3H -Cortisols gebunden werden, wird als Titer des Antiserums bezeichnet.

Diese Verdünnung lässt sich durch graphische Extrapolation aus Abb. 6 ermitteln. Für das Antiserum AK 127 ergibt sich ein Titer von 1:5000. Mit diesem Titer wurde in allen Radioimmunoassays gearbeitet.

Proz. Bindung

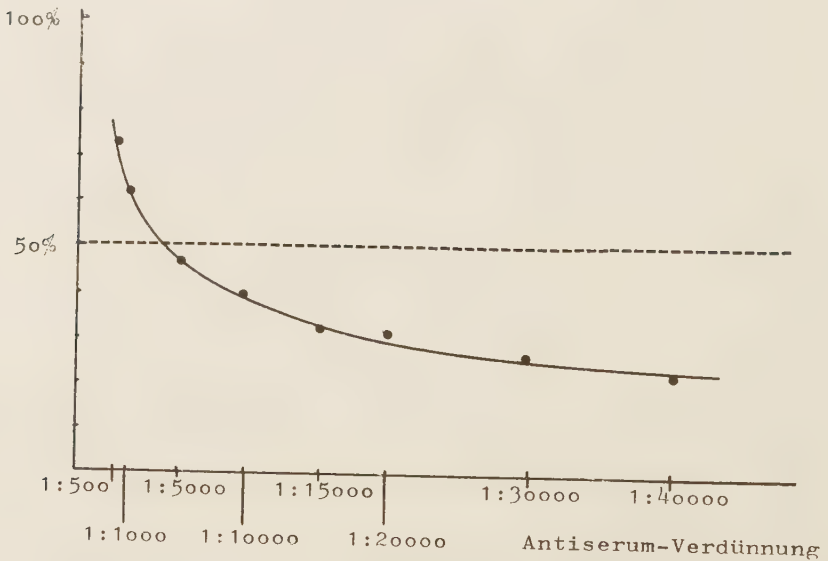


Abb. 6: Prozentuale Bindung von radioaktiv-markiertem Cortisol bei unterschiedlichen Verdünnungsstufen des Antiserums AK 127 zur Ermittlung des Titers.

3.4.2. Spezifität

Die Spezifität radioimmunologischer Methoden hängt vor allem von der Spezifität des Antiserums ab, d.h. von seiner Fähigkeit, unter einer Vielzahl gleichartiger Substanzen eine bestimmte Substanz selektiv zu erkennen und zu binden. Ein "ideales" Antiserum würde keinerlei Affinitäten zu anderen Substanzen aufweisen. Ein solches gibt es für Steroide aber nicht. Es ist immer damit zu rechnen, dass ähnliche Substanzen mitreagieren. Vor Verwendung eines Antiserums müssen deshalb dessen Kreuzreaktivitäten mit anderen Steroiden getestet werden. Dabei untersucht man die Verdrängung des radioaktiv-markierten Steroidmoleküls durch steigende Konzentrationen nicht markierter anderer Steroide aus der Antikörperbindung. Die Kreuzreaktivität anderer Steroide mit dem Antiserum AK 127 wird nach ABRAHAM (1) berechnet und in Prozent angegeben :

$$\frac{x}{y} \cdot 100 = \text{Prozent Kreuzreaktion}$$

Dabei bedeutet:

x = Menge des Cortisols, die erforderlich ist, um 50 % des am Antikörper gebundenen markierten Cortisols zu verdrängen

y = Menge des kreuzreagierenden Steroids, die nötig ist, um 50 % des markierten Cortisols vom Antikörper zu verdrängen.

Das Antiserum AK 127 weist folgende Kreuzreaktivitäten auf:

	<u>AK 127</u>
Cortison	100 %
Cortisol	100 %
17-OH-Progesteron	95 %
Progesteron	28 %
Desoxycorticosteron	20 %
Corticosteron	14 %
Testosteron	8 %
Androstendion	1 %
Aldosteron	1 %
Östradiol	0,01 %
Östron	0,01 %
17-OH-Pregnenolon	0,01 %
DHA	0,01 %

Die hohe Kreuzreaktivität von Cortisol und Cortison ist auf die Ähnlichkeit der Struktur zurückzuführen. Die beiden Steroide unterscheiden sich nur am C₁₁ durch eine Hydroxyl- bzw. Ketogruppe (S. 4). Diese Kreuzreaktivität stört jedoch bei klinischen Untersuchungen normalerweise nicht, da Cortison nur in der peripartalen Periode in grösseren Mengen im peripheren Blut nachweisbar ist (12). Auch die Kreuzreaktivität des 17-alpha-OH-Progesterons stört gewöhnlich in der klinischen Routinebestimmung nicht, da dessen Plasmakonzentration nur etwa ein Hundertstel von der des Cortisols beträgt. Beim kongenitalen, adrenogenitalen Syndrom vom 21-Hydroxylasemangeltyp staut sich das 17-alpha-OH-Progesteron, das Substrat der 21-Hydroxylase so stark an, dass bei unbehandelten und nicht ausreichend behandelten Personen die 17-alpha-OH-Progesteron Konzentrationen um das 100 bis 1000 fache erhöht und im Bereich der Cortisolwerte liegen können (28). Die Konzentrationen für Cortisol werden in diesen Fällen erheblich zu hoch gemessen.

3.5. Inkubationstemperaturen und pH-Bereiche im Radioimmunoassay (RIA)

Die Bindung zwischen Cortisol und Antikörper ist reversibel, temperatur- und pH-abhängig. Zur Erzielung reproduzierbarer Ergebnisse ist daher die Einhaltung konstanter Bedingungen notwendig. Sämtliche Inkubationen wurden in einem Eis-Wasser-Bad bei 0°C durchgeführt, da die Antikörper-Steroidkomplexe bei diesen niedrigen Temperaturen höhere Assoziationskonstanten aufweisen als bei Zimmertemperatur (8). Die Einhaltung von 0°C im Eiswasserbad ist ausserdem besonders einfach.

Im Verlauf von Probenvorbereitung und Assay ergeben sich durch die verschiedenen Pufferzugaben Änderungen des pH-Wertes, die mit einem Einstab-pH-Meter gemessen wurden (Abb. 7).

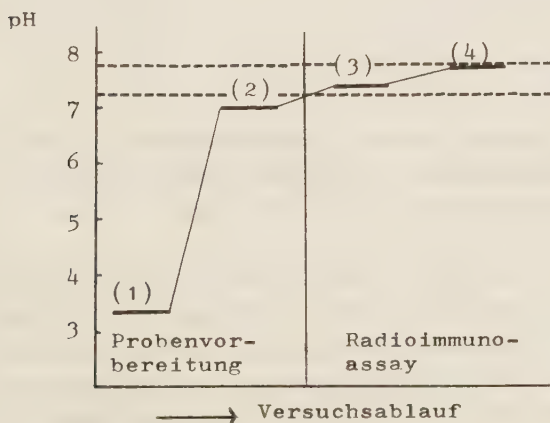


Abb. 7: Änderungen des pH-Wertes im Versuchsablauf durch Zugabe von:

- (1) Denaturierung von 10 µl Plasma in 0,2 ml Glutamatpuffer pH 3.3: pH 3.3
- (2) Umpufferung der denaturierten Plasmaproben mit 0,2 ml Phosphatpuffer pH 7.6: pH 6.9
- (3) Zugabe v. 0,1 ml 3H-Cortisol (Lösung 9) zu je 0,1 ml der umgepufferten Plasmaproben: pH 7.3
- (4) Zugabe v. 0,5 ml Antiserum (Lösung 10): pH 7.55

Nach Zugabe von ^3H -Cortisol und der AK-Lösung ist in der Inkubationsmischung ein pH-Bereich erreicht, der Veränderungen der Eigenschaften der Antikörper nicht erwarten lässt.

3.6. Inkubationsdauer des Cortisol-
Antikörper-Gemisches

Vorversuche hatten gezeigt, dass bereits nach 1 h Die Einstellung des Bindungsgleichgewichts bei 0°C nahezu erreicht war; Verlängerung der Inkubationszeiten auf 2, 4, 6, 12 und 24 Stunden liessen keine signifikanten Veränderungen erkennen. Diese Feststellung bestätigt die Ergebnisse der Untersuchungen von FOSTER und DUNN (17).

Für den Assay wurde eine Inkubationsdauer von 2 h gewählt. Auswirkungen durch den Zeitunterschied zwischen Beschickung des ersten und des letzten Röhrchens eines Assays mit Antiserum liessen sich nicht feststellen.

3.7. Zeitabhängigkeit der Trennung von freiem
und Antikörper-gebundenem Cortisol durch
Dextran-Kohle

Zur Messung der proteingebundenen Radioaktivität ist die Trennung der freien von den Antikörper-gebundenen Molekülen notwendig. Dies lässt sich bei den Steroiden leicht durch Adsorption der freien Steroidmoleküle an Kohle und anschliessende Zentrifugation erreichen (35). Die Radioaktivität im Überstand repräsentiert den proteingebundenen Anteil des radioaktiven Steroids. Der Zusatz von Dextran soll die Adsorption von Proteinen und damit von Antikörpern an die Kohle ver-

hindern (3, 20). Der Zusatz inerter Proteine - in diesem Fall von Gamma-Globulin - soll die Adsorption beladener Antikörper möglichst gering halten (31).

Das im Cortisol-Radioimmunoassay verwendete Kohle-Dextran-Gemisch (Lösung 3) gewährleistete eine gute Trennung der freien und Antikörper-gebundenen Cortisol-moleküle. Die Adsorption der Cortisolmoleküle ist Temperatur- und Zeit-abhängig. Die Konstanz hinsichtlich der Temperatur wird durch ein Eiswasserbad gewährleistet. Die Konstanz im Hinblick auf die Zeit ist nicht ideal durchführbar, da zwischen Beschickung des ersten und des letzten Röhrchens mit Kohle-Dextran Zeitunterschiede liegen.

Wie sich diese Zeitunterschiede auswirken, wurde getestet: in Ansätzen, die dem Nullwert im Radioimmunoassay entsprechen, wurde die Adsorption von ^3H -Cortisol-molekülen an Dextran-Kohle in einem Zeitraum von 5 bis 25 Minuten untersucht. Wie Abb. 8 zeigt, sind zwischen 5 und 25 Minuten die Werte nahezu konstant. Aus praktischen Gründen wurde für den Assay eine Inkubationszeit von 15 Minuten gewählt.

Die Zeitdifferenzen, die zwischen Beschickung des ersten und letzten Röhrchens auftreten, wurden in 5 Assays mit einer maximalen Probenanzahl von 90 Ansätzen pro Assay ermittelt. Sie betragen höchstens 5 Minuten. In diesen 5 Minuten ändert sich die Radioaktivität im Überstand durch vermehrte Adsorption von ^3H -Cortisol an Kohle nur um etwa 1 %. Diese geringe Änderung lässt sich vernachlässigen.

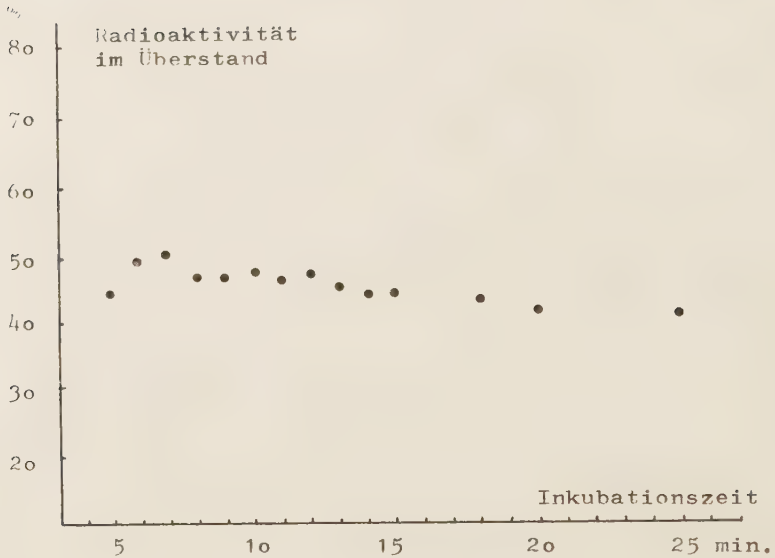


Abb. 8: Einfluß der Zeit auf die Adsorption von ^3H -Cortisol an Kohle-Dextran:
Bei Verlängerung der Inkubationszeit nimmt die nach Abzentrifugieren der Kohle-Dextran-Suspension im Überstand verbleibende Menge an ^3H -Cortisol leicht ab.

3.8. Qualitätskontrolle der Methode

3.8.1. Wiederfindung zugesetzter Mengen an Cortisol

Um die Wiederfindung definierter Cortisolmengen, die einem Plasma zugesetzt werden, zu testen, wurden einem Plasma mit niedrigen Cortisolkonzentrationen verschiedene Mengen Cortisol hinzugefügt. Hierzu wurde das Plasma eines endokrinologisch unauffälligen Mannes genommen, das nach dreitägiger Suppression mit je 1,5 mg Dexamethason p.o. gewonnen worden war. Die Cortisol-Konzentration dieses Plasmas wurde in sechs Assays bestimmt. Der Mittelwert betrug 7 µg Cortisol pro Liter. In dieses Plasma wurden definierte Cortisolmengen (Verdünnungsreihe 3) gegeben. Durch Mischen des in Puffer gelösten Cortisols und des Plasmas ergeben sich folgende theoretische Konzentrationen :
54, 104, 154, 204, 304 und 404 µg Cortisol/l.
Anschliessend wurden die Konzentrationen radioimmunologisch ermittelt und mit den theoretischen Konzentrationen verglichen. Um zu prüfen, ob sich durch Messungen in unterschiedlichen Bereichen der Eichkurve unterschiedliche Werte ergeben, wurde einmal mit 5 µl und einmal mit 10 µl Plasmaeinsatz gearbeitet. Insgesamt wurden 8 Radioimmunoassays durchgeführt, mit je 5 µl und 10 µl Plasmaeinsatz. Die gefundenen Werte sind in Tabelle 4 aufgeführt.

Tabelle 4: Wiederfindung von Cortisol, das
"Dexamethason"-Plasmen hinzugefügt wurde

Mittelwert aus 8 RIA's

Hinzugefügt	Gefunden ⁺ ug/l	Theoretischer Wert ug/l	Wiederfindung %
-------------	-------------------------------	-------------------------------	--------------------

Plasmaeinsatz: 10 ul

0	4	-	-
50	43	54	80
100	105	104	101
150	161	154	105
200	214	204	105
300	324	304	107
400	437	404	108

Plasmaeinsatz: 5 ul

0	4	-	-
50	48	54	89
100	103	104	99
150	160	154	104
200	203	204	100
300	326	304	107
400	417	404	103

⁺ Dieser Wert wurde in dem mit Puffer 1 : 1 verdünnten Plasma gefunden.

Hinzugefügtes Cortisol wird praktisch vollständig wiedergefunden. Das bedeutet, dass die Bindungsproteine völlig denaturiert sind und beim Abzentrifugieren kein Cortisol mitgerissen wird. Sowohl mit 5 als auch mit 10 ul Plasmaeinsatz lässt sich von sehr niedrigen bis zu sehr hohen Konzentrationsbereichen messen.

3.8.2. Präzision innerhalb der Serie

Um die Präzision bei der Ermittlung von Werten im Normbereich innerhalb der Serie zu prüfen, wird ein Kontrollplasma in einem Assay 12 mal bestimmt. Die gemessenen Werte gehen aus Tabelle 5 hervor.

Tabelle 5: Präzision innerhalb der Serie

Alle Konzentrationen in $\mu\text{g/l}$:

135
128
110
114
128
112
134
121
122
132
118
129

Anzahl der Bestimmungen:	n	=	12
Mittelwert	:	$\bar{x}$	= 124 $\mu\text{g/l}$
Standardabweichung	:	s	= 8,7 $\mu\text{g/l}$
Variationskoeffizient	:	VK	= 7,0 %

Ein Variationskoeffizient innerhalb der Serie von 7 % ist für eine radioimmunologische Methode akzeptabel.

3.8.3. Präzision von Tag zu Tag

Um die Präzision von Tag zu Tag zu untersuchen, wurde dasselbe Plasma in 22 Assays als Kontrollwert mitgeführt. Die gemessenen Werte gehen aus Tabelle 6 hervor.

Tabelle 6: Präzision von Tag zu Tag

Werte: (alle Konz. in $\mu\text{g/l}$)

140	135	116	
122	135	130	
119	128		
132	138	Anzahl der Werte	: $n = 22$
128	106	Mittelwert d.Konz.:	$\bar{x} = 128 \mu\text{g/l}$
135	132	Standardabweichung:	$s = 9,9 \mu\text{g/l}$
139	130	Var.Koeff.	: $VK = 7,8 \%$
125	115		
130	132		
105	135		

Die Streuung zwischen den Assays liegt unterhalb der 10 % - Grenze und entspricht damit der in den Richtlinien der Bundesärztekammer festgelegten Grenze von einem Variationskoeffizienten von maximal 10 % für schwierige biochemische Analysen (48).

Einfacher und hygienischer als das Mitführen eines Patientenplasmas ist es, auf handelsübliche Kontrollproben zurückzugreifen.

In einer grösseren Reihe wird hierfür das Moni-trol 1 (Reagenz 16) getestet. Moni-trol 1 ist ein aus Humanblut hergestelltes lyophilisiertes, das pro Fläschchen mit genau 5 ml Aqua dest. versetzt und bis zum völligen Auflösen mindestens eine halbe Stunde ruhig stehen gelassen werden muss. Dann wird die Lösung in kleine Mengen fraktioniert und tiefgefroren. Einmal aufgetaute Proben wurden nicht wieder verwendet. Die in 55 Assays gefundenen Konzentrationen sind in Tabelle 7 aufgeführt.

Die von uns in Moni-trol 1 gefundene Konzentration entspricht nicht der auf dem Packzettel angegebenen Cortisolkonzentration. Dies wurde durch eine im Labor durchgeführte Methode (43), bei der Cortisol nach chromatographischer Reinigung bestimmt wird (S.44) bestätigt.

Die Diskrepanz zwischen den radioimmunologisch gemessenen Werten und den höheren Angaben auf dem Packzettel liegt daran, dass die von der Hersteller-Firma genannten Kontrollwerte fluorometrisch bestimmt werden.

Tabelle 7: Interassayvariation des Cortisols in
Moni-trol 1 (in ug/l)

Assay-Nr.	Konz.	Assay-Nr.	Konz.
1	93	29	99
2	109	30	103
3	108	31	93
4	124	32	102
5	118	33	89
6	107	34	102
7	104	35	100
8	108	36	106
9	110	37	118
10	112	38	112
11	106	39	92
12	116	40	86
13	123	41	103
14	110	42	100
15	111	43	106
16	111	44	112
17	97	45	107
18	128	46	114
19	111	47	122
20	117	48	124
21	93	49	118
22	105	50	107
23	107	51	122
24	115	52	122
25	125	53	112
26	103	54	125
27	122	55	113
28	103		

Anzahl der Werte	: n	=	55
Mittelwert der Konz.:	$\bar{x}$	=	109 ug/l
Standardabweichung	: s	=	9,9 ug/l
Var.Koeff.	: VK	=	9,0 %

Ein Interassay-Variationskoeffizient von 9 % ist für eine radioimmunologische Methode akzeptabel (48).

4.

Vergleich mit anderen RIA-Methoden

Die "Neue Methode", mit der das Cortisol direkt und ohne vorherige Extraktion im denaturierten Plasma radioimmunologisch bestimmt wird, wird den beiden im Labor routinemässig zur Cortisolbestimmung angewandten RIA-Methoden gegenübergestellt:

Bei der ersten, "chromatographischen Methode" genannt, werden die Steroide aus einem Probenvolumen von 50 μ l Plasma mit Dichlormethan extrahiert. Das wegen seiner Kreuzreaktion störende 17-alpha-OH-Progesteron (S.34) wird in einer Verteilungs-chromatographie zwischen H_2O und Tetrachlorkohlenstoff (CCl_4) vom polaren Cortisol abgetrennt, das in der wässrigen Lösung zurückbleibt und daraus bestimmt wird (43).

Bei der zweiten, wesentlich einfacheren und deshalb als "Schnell-Assay" bezeichneten Methode, ist der Radioimmunoassay der gleiche wie in der "chromatographischen Methode", bei der Probenvorbereitung wird jedoch auf die Verteilungschromatographie zwischen H_2O und CCl_4 verzichtet. Die Kreuzreaktion der Antikörper mit 17-alpha-OH-Progesteron und anderen Steroiden wird bei dringlichen Bestimmungen als Fehlerquelle in Kauf genommen. Die mit dieser Methode gemessenen Cortisolkonzentrationen sind also zu hoch.

Zum Vergleich werden 54 willkürlich ausgewählte Plasmen mit der "neuen" und mit den beiden "alten" Methoden bestimmt.

Im statistischen Vergleich der drei Methoden wird die "chromatographische" als die theoretisch bessere der

alten Methoden als Referenzmethode angenommen und der "Schnell-Assay" sowie der "Neue Assay" mit ihr verglichen. Alle Werte der alten Methoden wurden innerhalb eines Assays aus Doppelbestimmungen, alle Werte der "neuen Methode" aus Dreifachbestimmungen ermittelt. Die mit diesen verschiedenen Methoden gefundenen Werte sind in Abb. 9 und Abb. 10 sowie in Tabelle 11 aufgeführt.

Beim Vergleich kommt der t-Test für gepaarte Beobachtungen nach Student zur Anwendung.

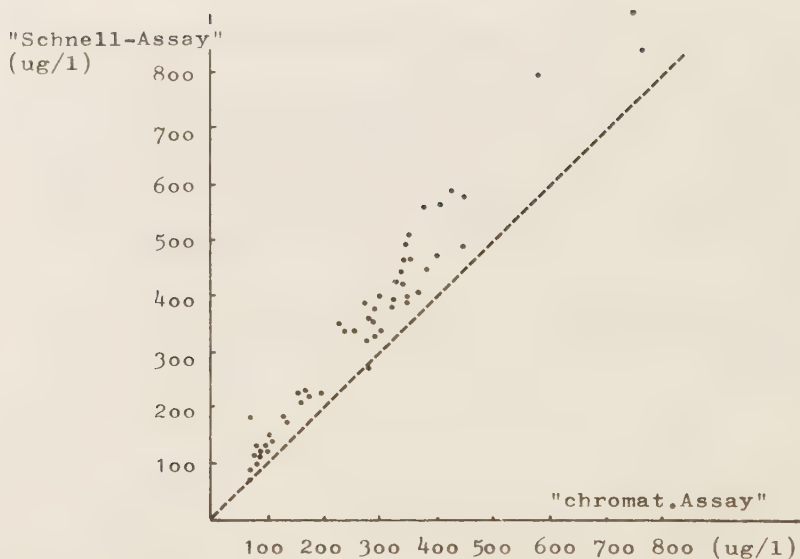


Abb. 9: Vergleich der Cortisolkonzentrationen von "chromatographischem Assay" und "Schnell-Assay"

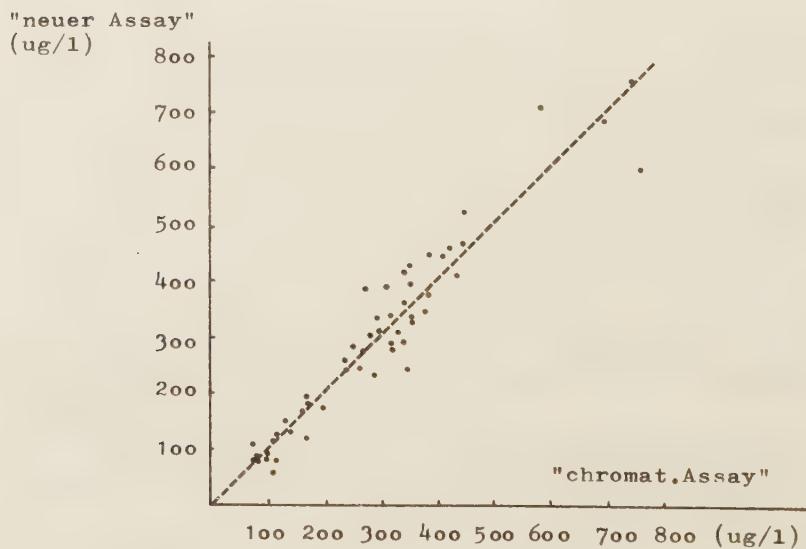


Abb. 10: Vergleich der Cortisolkonzentrationen von "chromatographischem Assay" und "neuem Assay"

Vergleich "Schnell-Assay" zu "chromatographischem Assay":

Anzahl der Wertepaare:	n = 54
Student-t-Wert:	t = 10,1779
Student-t-Schwellenwert mit 53 Freiheitsgraden und P = 0,001:	+ 3,485

Ergebnis:

Das errechnete t ist grösser als der für 53 Freiheitsgrade angegebene Schwellenwert von t. Damit wird die Nullhypothese auf dem 0,1 % - Signifikanzniveau verworfen, d.h. die Werte sind mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 0,1 % nicht gleich.

Wertung:

Die Ergebnisse des "Schnell-Assays" liefern zu hohe Werte, was nicht nur der Unspezifität gegenüber anderen Steroiden, sondern auch anderen Störfaktoren, wie z.B. Lipiden, zuzuschreiben ist.

Vergleich "neuer Assay" zu "chromatographischem Assay":

Anzahl der Wertepaare:	n = 54
Student-t-Wert:	t = 0,1774
Student-t-Schwellenwert mit 53 Freiheitsgraden und P = 0,001:	+ 3,485

Ergebnis:

Das errechnete t ist kleiner als der angegebene Schwellenwert von t; damit wird die Nullhypothese auf dem 0,1 % - Signifikanzniveau akzeptiert.

Wertung:

Statistisch lassen sich die Werte der "Neuen Methode"

mit denen der "chromatographischen Methode" mit einer sehr kleinen Irrtumswahrscheinlichkeit als gleich einstuft.

Bei der Denaturierung des Plasmas werden zwar die störenden Steroide nicht entfernt, wohl aber andere Störfaktoren, wie z.B. die Lipide.

4.1. Vergleich "Schnell-Assay" zu "neuem Assay"

Der Grad der Übereinstimmung zwischen "Schnell-Assay" und "neuem Assay" wird anhand der grösseren Fallzahl von $n = 171$ überprüft. Die Plasmen sind durch Zufallsauswahl gezogen.

Alle Werte des Schnell-Assays werden aus Doppelbestimmungen, die der "direkten Methode" aus Dreifach-Bestimmungen innerhalb der gleichen Serie gewonnen.

Die Werte sind in Tabelle 12 aufgeführt.

Beim Vergleich kommt der t-Test für gepaarte Beobachtungen nach Student zur Anwendung:

Vergleich "Schnell-Assay" zu "neuem Assay":

Anzahl der Wertepaare:	$n = 171$
Student-t-Wert:	$t = -8,6743$
Student-t-Schwellenwert mit 170 Freiheitsgraden und $P = 0,001$:	$\pm 3,355$

Ergebnis:

Das errechnete, negative t ist grösser als der negative t -Schwellenwert; die Nullhypothese wird auf dem 0,1 % - Signifikanzniveau verworfen. Die gemessenen Werte des "Schnell-Assays" stimmen statistisch gesehen weder mit denen des "chromatographischen", noch mit denen des "neuen Assays" überein. Auf Grund der schlechten Ergebnisse wird der "Schnell-Assay" im Labor nicht mehr durchgeführt.

4.2. Vergleich "chromatographischer Assay"
zu "neuem Assay"

Die Übereinstimmung der Werte der "chromatographischen Methode" mit denen der "neuen Methode", die bereits anhand von 54 Plasmen geprüft wurde (Seite 47), wird anhand der grösseren Fallzahl von $n = 265$ verifiziert. Die Plasmen werden durch Zufallsauswahl gezogen. Die Werte des "chromatographischen Assays" werden aus Doppelbestimmungen, die der "neuen Methode" aus Dreifach-Bestimmungen innerhalb der gleichen Serie gewonnen. Die Werte sind in Tabelle 13 aufgeführt. Beim Vergleich kommt der t-Test für gepaarte Beobachtungen nach Student zur Anwendung.

Vergleich "neuer Assay" zu chromatographischem Assay"

Anzahl der Wertepaare:	$n = 265$
Student-t-Wert:	$t = -1,2739$
Student-t-Schwellenwert mit 264	
Freiheitsgraden und $P = 0,001$:	$\pm 3,333$

Ergebnis:

Das errechnete, negative t ist kleiner als der negative t -Schwellenwert; die Nullhypothese wird auf dem 0,1 % - Signifikanzniveau angenommen. Damit wird das aus einer kleineren Fallzahl gewonnene Ergebnis von Seite 47 bestätigt. Statistisch sind die mit beiden Methoden gewonnenen Werte als gleich zu werten. Durch die Zufallsauswahl kamen auch AGS-Plasmen zum Vergleich. In Tabelle 13 sind diese mit einem Stern gekennzeichnet. Die hohen 17-alpha-OH-Progesteronkonzentrationen einiger dieser Plasmen beeinflussten zwar im Einzelfall das Ergebnis stark, störten aber insgesamt die gute Korrelation zwischen den mit beiden Methoden gemessenen Werten nicht.

4.3. Vergleich der Ergebnisse von Dreifach-
 Bestimmungen mit denen von Zweifach-
 Bestimmungen im "neuen Assay"

Zur Beantwortung der Frage, ob Dreifach-Bestimmungen im "neuen Assay" notwendig sind oder ob Zweifach-Bestimmungen ausreichen, wird durch Zufallsauswahl aus allen mit der "neuen Methode" durchgeführten Assays eine Stichprobe von $n = 177$ Werten gezogen. In den gezogenen Assays werden von den drei zur Cortisolkonzentrationsermittlung benützten Einzeldaten, einschliesslich der Daten der Eichkurven, zwei durch Zufallszuteilung ausgewählt. Mit diesen Daten werden an neuen Eichkurven die neuen Cortisolkonzentrationen ermittelt und diese Doppelbestimmungen mit den Werten der Dreifach-Bestimmungen verglichen.

Die Werte sind in Tabelle 14 aufgeführt.

Beim Vergleich kommt der t-Test für gepaarte Beobachtungen nach Student zur Anwendung.

Vergleich der Dreifach-Bestimmungen zu den Zweifach-Bestimmungen im "neuen Assay":

Anzahl der Wertepaare:	$n = 177$
Student-t-Wert:	$t = -0,33$
Student-t-Schwellenwert mit 176 Freiheitsgraden und $P = 0,001$:	$\pm 3,352$

Ergebnis:

Das errechnete t ist kleiner als der für 176 Freiheitsgrade angegebene Schwellenwert. Somit wird die Nullhypothese auf dem 0,1 % - Signifikanzniveau angenommen. Die Werte, die aus Zweifach- oder Dreifach-Bestimmungen gewonnen werden, sind als gleich anzusehen.

Es ist also erlaubt, Dreifach-Bestimmungen der "neuen Methode" mit Doppelbestimmungen der anderen Methoden zu vergleichen.

Ausserdem zeigt der Vergleich, dass Zweifach-Bestimmungen zu zuverlässigen Ergebnissen führen, sodass man sich den grösseren Aufwand von Dreifach-Bestimmungen sparen kann.

4.4. Dexamethason- und Synacthen-Teste im Wertevergleich zwischen "neuem Assay" und "chromatographischem Assay"

Die Frage, ob nach Dexamethason- oder Synacthen-Testen und bei den daraus folgenden Messungen in sehr hohen und sehr niedrigen Konzentrationsbereichen im "chromatographischen Assay" und im "neuen Assay" identische Werte bzw. gleiche Anstiege oder Abfälle der Konzentrationen auftreten, wird anhand von 50 Synacthentesten und 25 Dexamethasontesten geprüft.

Es wäre möglich, dass sich durch die pharmakologische Beeinflussung des Endokriniums die Steroide in ihren Relationen zueinander verschieben, was die radioimmunologische Messung beeinflussen könnte.

Die Werte für die Synacthenteste sind in Tabelle 15, für die Dexamethasonteste in Tabelle 16 festgelegt.

4.4.1. Synacthenteste

Vergleich "neuer Assay" zu "chromatographischem Assay": Verglichen werden die Konzentrationsanstiege, die mit beiden Methoden vor und nach Stimulation mit Synacthen gemessen wurden.

Zur Anwendung kommt der t-Test für gepaarte Beobachtungen nach Student.

Arithmetischer Mittelwert der Konzentrationsanstiege nach Stimulation:

" neue Methode":	$\bar{x} = 195,0 \text{ ug/l}$
"chromatographische Methode"	$\bar{x} = 197,4 \text{ ug/l}$
Arithmetischer Mittelwert der Differenzen D:	$\bar{D} = 2,4 \text{ ug/l}$
Standardabweichung des Mittelwertes $\bar{D}$:	$S_{\bar{D}} = 8,0 \text{ ug/l}$
Student-t-Wert:	$t = -0,301$
Student-t-Schwellenwert mit 49 Freiheitsgraden und $P = 0,001$:	$\pm 2,680$

Ergebnis:

Die arithmetischen Mittelwerte der Konzentrationsanstiege unterscheiden sich nur um ca. 1 %. Die gute Korrelation der mit beiden Methoden ermittelten Werte wird durch den t-Test für gepaarte Beobachtungen nach Student bestätigt. Der errechnete, negative t-Wert ist kleiner als der negative t-Schwellenwert; Die Nullhypothese wird auf dem 0,1 % - Signifikanzniveau akzeptiert. Die "neue Methode" eignet sich bei der Anwendung von Synacthen-Stimulations-Testen ebenso gut zur Plasmakonzentrationsmessung von Cortisol wie die "chromatographische Methode".

4.4.2.

Dexamethasonteste

Vergleich "neuer Assay" zu "chromatographischem Assay:

Anzahl der Wertepaare:	n = 25
Arithmetischer Mittelwert der Konzentrationsabfälle nach Suppression:	
"direkte Methode"	$\bar{x} = 119,5$
	s = 65,6
Abfall in %	89,9 %
"chrom. Assay"	$\bar{x} = 153,4$
	s = 88,2
Abfall in %	91,3 %

t-Test für gepaarte Beobachtungen nach Student für die Konzentrationsabfälle in beiden Methoden nach Suppression:

Student-t-Wert:	t = -3,711
Student-t-Schwellenwert mit 24 Freiheitsgraden und P = 0,001:	$\pm 3,745$

Ergebnis:

Der errechnete, negative t-Wert ist kleiner als der negative t-Schwellenwert für 24 Freiheitsgrade; die Nullhypothese wird deshalb angenommen; die mit den zwei Methoden bestimmten Konzentrationsabfälle sind gleich.

Die Verminderung der Plasma-Cortisol-Konzentration nach Dexamethason-Suppression beträgt bei beiden Methoden ca. 90 % des Ausgangswertes.

Danach eignet sich die "neue Methode" genau so gut wie die im Labor praktizierte "chromatographische Methode" (43) für die beiden wichtigsten Nebennierenfunktionsteste.

4.5. Normalwerte

Zur Untersuchung von "Normalwerten" mit der "neuen Methode" wird von 92 endokrinologisch unauffälligen Versuchspersonen im Alter von 2 Monaten bis zu 27 Jahren Blut aus der V. cubitalis entnommen und die Plasma-Cortisol-Konzentration bestimmt. Mit Ausnahme der ersten Lebenstage eines Säuglings bestehen keine Alters- und Geschlechts-Unterschiede (39) sodass auf Alter und Geschlecht keine Rücksicht genommen wurde. Es muss aber ein circadianer Rhythmus des Plasmacortisolspiegels beachtet werden (24). Frauen in der Gravidität sowie unter Behandlung mit Östrogenen und Contraceptiva sind nicht in die Studie aufgenommen, da ein Anstieg der Östrogene zu einem erheblichen Anstieg des Transcortins führt und die Cortisolspiegel stark beeinflusst (4, 25).

In Abb. 11 sind die gefundenen Plasma-Cortisolspiegel in Abhängigkeit zur Tageszeit der Abnahme dargestellt (Tabelle 17).

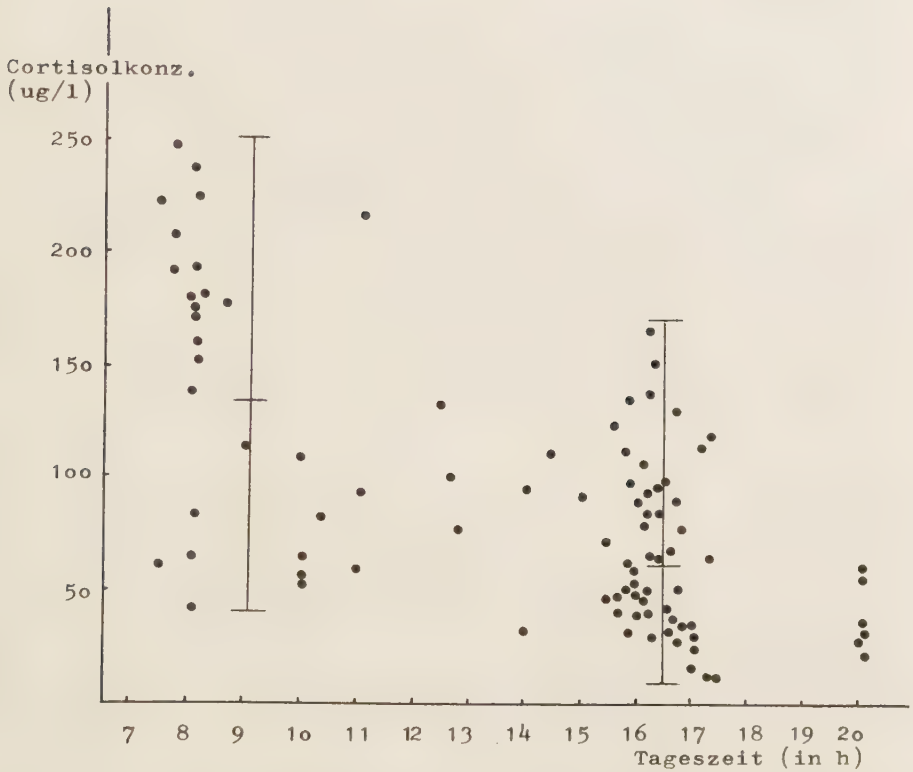


Abb. 11: Plasmacortisolspiegel in Abhängigkeit von der Tageszeit, bestimmt mit der "neuen Methode". Außerdem sind Mittelwert und Bereich der Plasma-Cortisolkonzentration zwischen 8⁰⁰- 10⁰⁰ Uhr und 16⁰⁰- 18⁰⁰ Uhr angegeben.

Ergebnis:

Es zeigt sich der erwartete Tagesrhythmus (24) mit hohen Werten am Morgen ($\bar{x} = 133 \text{ ug/l}$; 41 - 248 ug/l) und niedrigeren Werten am Abend ($\bar{x} = 68 \text{ ug/l}$; 11 - 168 ug/l).

In der nachfolgenden Tabelle werden die zwischen 8⁰⁰ - 10⁰⁰ und 16⁰⁰ - 18⁰⁰ Uhr gemessenen Normalwerte der "neuen Methode" und die in der Literatur angegebenen und mit Hilfe verschiedener Methoden ermittelten Normbereiche angeführt.

Die mit der "neuen Methode" gemessenen Cortisol-Konzentrationen lassen sich gut mit den radioimmunologisch gewonnenen Werten anderer Autoren vergleichen (Tabelle 8).

Tabelle 8: Normbereiche von Cortisol in der Literatur

Autor	Methode	Probenanzahl	Normwerte (ug/l)	Jahr
<u>Morgenwert: 8⁰⁰ - 10⁰⁰ Uhr</u>				
Silber et.al.(53)	Fluorim.M.	-	235	1958
DeMoor et.al.(11)	Fluorim.M.	673	177	1962
Vermeulen et.al.(56)	Fluorim.M.	50	146 $\pm$ 37	1964
Hamanaka et.al.(23)	CBG	-	129 $\pm$ 5	1970
Newsome et.al.(40)	CBG	-	123 $\pm$ 8	1972
Foster et.al.(17)	RIA	-	50 - 200	1974
Donohue et.al.(13)	RIA	112	45 - 180	1974
Vorliegende Arbeit	RIA	19	133 (41 - 248)	1976
<u>Abendwert: 16⁰⁰ - 18⁰⁰ Uhr</u>				
Hamanaka et.al.(23)	CBG	19	71 $\pm$ 5	1970
Foster et.al.(17)	RIA	-	20 - 150	1974
Donohue et.al.(13)	RIA	112	40 - 100	1974
Vorliegende Arbeit	RIA	39	68 (11 - 168)	1976

4.6. Tagesprofile

Zur Untersuchung von "Cortisol-Tagesprofilen" mit der "neuen Methode" wird von fünf endokrinologisch unauffälligen Versuchspersonen über den Tag verteilt vier bis fünf mal Blut aus der V. cubitalis entnommen. Alle Plasma-Cortisol-Konzentrationen einer Versuchsperson werden innerhalb eines Assays bestimmt. Die Entnahmezeiten und gemessenen Konzentrationen sind in Tabelle 18 aufgeführt und in Abb. 12 graphisch dargestellt.

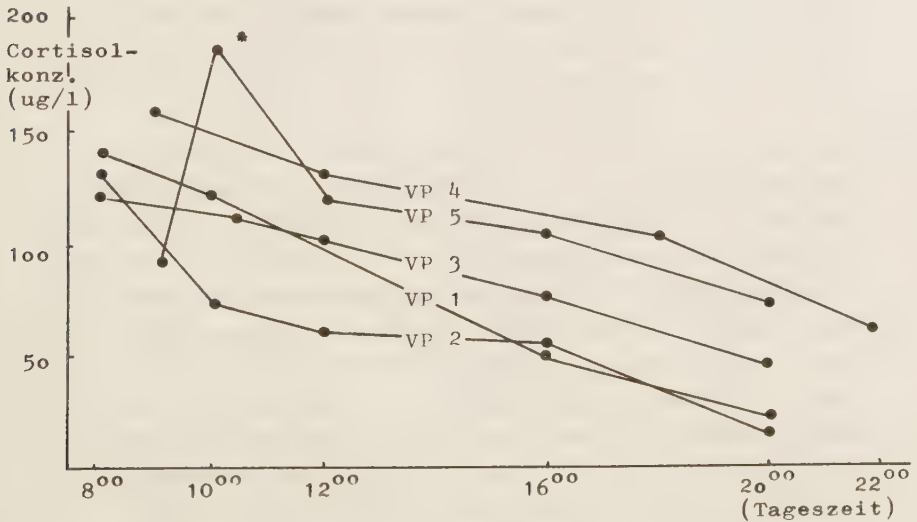


Abb. 12: Plasma-Cortisol-Tagesprofile von 5 endokrinologisch unauffälligen Versuchspersonen (VP), bestimmt mit der "neuen Methode".

* Das mit einem Stern gekennzeichnete Tagesprofil stammt von einer VP nach 1-stündigem Tennisspiel, das um 8³⁰ Uhr beendet wurde.

Der Verlauf der Tagesprofile in Abb. 12 mit hohen Werten am Morgen und niedrigen Werten am Abend entspricht den aus Abb. 11 abgeleiteten Erwartungen. Auf Grund der relativ weit auseinander liegenden Messpunkte lässt sich nicht entscheiden, ob es sich bei den im Laufe des Tages eintretenden Konzentrationsverminderungen um einen kontinuierlichen Abfall des Plasma-Cortisolspiegels handelt oder ob z.B. am Nachmittag vorübergehend wieder ein Anstieg erfolgt.

4.7. Vergleichende Cortisolmessung in Serum
 und Plasma. Einfluss einer 24 - h -
 Lagerung auf die Cortisol-Konzentration
 im Serum

In dieser Arbeit wurden alle bisherigen Konzentrationsmessungen für Cortisol im Blutplasma durchgeführt. Da es denkbar ist, dass die Denaturierung der Proteine im Plasma anders verläuft als im Serum, wird geprüft, ob sich Unterschiede in der Konzentration ergeben, je nachdem, ob in Serum oder Plasma gearbeitet wird. Dazu werden von 13 Versuchspersonen je 3 Proben aus der V. cubitalis genommen: aus der ersten Probe wird sogleich Plasma, aus der zweiten Probe Serum gewonnen. Die dritte Probe wird vor der Zentrifugation 24 h als nicht heparinisiertes Vollblut bei Zimmertemperatur aufbewahrt, um zu prüfen, ob durch längere Lagerung und Versand Änderungen der Cortisol-Konzentrationen eintreten könnten. Die in den drei Proben gemessenen Cortisol-Konzentrationen werden in Tabelle 9 aufgeführt:

Tabelle 9: Vergleichende Cortisolmessung in Serum und Plasma. Einfluss einer 24 stündigen Lagerung von Vollblut auf die Serum-Cortisol-Konzentration

Versuchspersonen	Probe 1 Plasma	Probe 2 Serum frisch	Probe 3 Serum nach 24-h-Lagerung als Vollblut
(alle Konzentrationen in ug/l)			
1	139	146	152
2a	228	- +	231
2b	184	188	- +
3	130	129	132
4	120	109	113
5	89	86	92
6	63	74	62
7	82	77	72
8	100	82	75
9	77	75	121
10	131	126	124
11	186	190	196
12	117	112	83
13	104	112	126
14	72	72	68

+ : Diese Proben wurden nicht analysiert.

Zur Anwendung kommt der t-Test für gepaarte Beobachtungen nach Student:

Vergleich Probe 1 mit Probe 2:

Anzahl der Wertepaare:	n = 13
Mittelwert: Probe 1	$\bar{x} = 114 \text{ ug/l}$
Probe 2	$\bar{x} = 113 \text{ ug/l}$
Student-t-Wert:	t = -0,551
Student-t-Schwellenwert mit 12 Freiheitsgraden und P = 0,01:	$\pm 3,012$

Vergleich Probe 1 mit Probe 3:

Anzahl der Wertepaare:		n =	13
Mittelwert:	Probe 1	$\bar{x}$ =	117 ug/l
	Probe 3	$\bar{x}$ =	118 ug/l
Student-t-Wert:		t =	0,127
Student-t-Schwellenwert mit 12 Freiheitsgraden und P = 0,01:		$\pm$	3,012

Ergebnis:

Die "neue Methode" ist im Serum oder Plasma mit identischen Ergebnissen durchzuführen.

Beim t-Test für gepaarte Beobachtungen nach Student liegen die gemessenen t-Werte weit unterhalb der t-Schwellenwerte. Die Nullhypothese wird deshalb mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 1 % akzeptiert. Die gemessenen Konzentrationen der Probe 1 und 2 sind als gleich zu bewerten.

Das Gleiche trifft zu auf den Vergleich zwischen frischem Plasma und dem Serum, das 24 Stunden als Vollblut bei Zimmertemperatur gelagert wurde. Die Cortisol-Konzentrationen in den Proben haben sich trotz Wärme und Lagerungsdauer nicht verändert.

4.8. AGS-Plasmen

Das Antiserum AK 127 besitzt zu 17-alpha-OH-Progesteron eine Kreuzreaktivität von 95 %.

Da es beim unbehandelten oder nicht ausreichend behandelten AGS zu einem gewaltigen Aufstau des 17-alpha-OH-Progesterons - bis auf das 100 bis 1000 fache der Normalwerte (28) - kommt, kann diese Unspezifität zu erheblich falsch hohen Cortisol-Konzentrationen führen.

Die Fehler können in ihrer Grössenordnung den Normbereichen für Cortisol (S.56) entsprechen. Um das Ausmaß dieser Fehlbestimmung zu testen, wurde das Cortisol mit der "neuen Methode" bestimmt und mit den Werten verglichen, die mit der "chromatographischen Methode" (43) erstellt worden waren. Da gleichzeitig die Konzentration des 17-alpha-OH-Progesterons der einzelnen Plasmen bekannt war, liess sich die theoretische Cortisol-Konzentration ermitteln (Tabelle 10).

Tabelle 10: AGS-Plasmen, mit dem "neuen Assay" unter Verwendung des Antiserums AK 127 bestimmt

Plasma Nr.	Cortisol Chrom.A.	17-alpha- OH-Pro-	theoret.Konz. (AK 127)	gemess.Konz. Neuer A.	%, der theoret. Konz.
(alle Konzentrationen in ug/l)					
1	109	19	126	158	125
2	106	116	216	224	104
3	291	34	323	309	96
4	35	71	102	67	66
5	90	13	102	112	110
6	162	66	225	218	97
7	64	27	90	94	104
8	12	113	119	124	104
9	168	94	257	228	89
10	66	60	123	138	112
11	12	21	32	32	100
12	13	38	49	49	100
13	19	145	157	100	64
14	61	139	193	197	102
15	100	87	183	119	65
16	30	25	58	48	83
17	22	55	74	67	91
18	46	29	74	81	109
19	66	108	169	146	86
20	110	71	177	193	109
21	43	20	62	103	166

Die theoretische Konzentration lässt sich abschätzen aus der mit der chromatographischen Methode nach PHAM-HUU-TRUNG (43) ermittelten Cortisol-Konzentration zuzüglich von nahezu 100 % der 17-alpha-OH-Progesteron-Konzentration. In Tabelle 10 sind 21 Plasmen von Kindern mit behandeltem und unbehandeltem kongenitalen, adrenogenitalen Syndrom aufgeführt.

Die tatsächlich mit dem "neuen Assay" gemessenen Konzentrationen betragen im Mittel 99,1 % der erwarteten "theoretischen Konzentrationen", d.h. ein Radioimmunoassay, bei dem das Antiserum AK 127 unter Verzicht auf chromatographische Reinigung verwendet wird, liefert die erwartet falsch hohen Werte.

Dieses Ergebnis unterstreicht die Wichtigkeit der Testung der Antikörper. Will man diese "neue Methode" auf die Fragestellung beim kongenitalen adrenogenitalen Syndrom anwenden, muss man unbedingt einen spezifischeren Antikörper verwenden.

5. Kostenberechnung

Bei dem hohen Probenanfall in der Cortisolbestimmung fällt der Wert der gebrauchten Chemikalien und sonstigen Materialien besonders stark ins Gewicht. Nicht zuletzt entscheidet eine Kosten-Nutzen-Analyse deshalb über die Durchführbarkeit einer Analysenmethode. Im folgenden wird die Kostenberechnung für die "neue Methode" erstellt.

5.1. Materialien

Der Kostenberechnung sind die Einkaufspreise des Labors zugrunde gelegt (incl. MWSt). Als realistisch wird für die Lösungen Glutamatpuffer, Phosphatpuffer, Ak- und Kohle-Lösung ein Verlust von 10 %, für die ^3H -Cortisol-Lösung ein Verlust von 20 % des Neuansatzes angesehen. Mehrfach benützte Eppendorf-Pipettenspitzen werden in der Kostenberechnung entsprechend einer mittleren Benützung von 50 Pipettierschritten anteilmässig entsprechend umgelegt. Die Kosten beziehen sich jeweils auf einen Probenansatz:

Glasröhrchen 75 x 10 mm	1 Stück	0,0615 DM
Glasröhrchen 75 x 14 mm	1 Stück	0,0636 DM
Eppendorf-Pipettenspitze	1 Stück	0,0500 DM
Eppendorf-Pipettenspitzen, (mehrfach Gebrauch)	5 Stück	0,0050 DM
Glutamatpuffer	0,2 ml	0,0008 DM
Phosphatpuffer	0,2 ml	0,0007 DM
^3H -Cortisol-Lösung	0,1 ml	0,0123 DM
Antikörperlösung	0,5 ml	0,0020 DM
Kohlelösung	0,5 ml	0,0092 DM
Szintillationsflüssigkeit	10 ml	0,2133 DM
Einmal-Mikrokapillare	1 Stück	0,1060 DM
Parafilm	1 Stück	0,0053 DM
Polyäthylenzählröhrchen mit Verschluss	1 Stück	0,0960 DM

Materialkosten pro Ansatz: 0,6257 DM

In diese Kosten sind die Lohn- und Energie-Kosten nicht einbezogen.

Für den "chromatographischen Assay" (48) werden Lösungsmittel wie Dichlormethan und Tetrachlorkohlenstoff gebraucht, die sehr teuer und stark toxisch sind.

5.2. Praktikabilität

Die Anzahl der Ansätze, die in einem Assay mitgeführt werden können, ist durch die Kapazität der Kühlzentrifuge auf 90 begrenzt. Die Arbeitszeit, einschliesslich der Zeit, die für die Inkubationspausen und die Auswertung der Ergebnisse benötigt wird, wurde daher auf jeweils 90 Ansätze bezogen und an 6 Arbeitstagen gemessen.

Dabei ergab sich, dass eine eingearbeitete Person diese 90 Ansätze problemlos an einem Arbeitstag bewältigen kann. Das entspricht bei Durchführung der Messung im Doppelansatz und nach Abzug der Cortisolstandards und Kontrollen einer Analysenkapazität von maximal 36 Plasmen pro Arbeitstag. Die Zähldauer der 90 Ansätze im Counter beträgt unter den gewählten Bedingungen (S.18) im Durchschnitt rund 13 Stunden.

5.3. Wertung

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die "neue Methode" bei weitem kostengünstiger als die eingeführten Labormethoden (43) ist. Teure Lösungsmittel sind nicht notwendig, es wird mit billigen Chemikalien und einem höheren Probendurchsatz pro Assay gearbeitet. Da zur Probenvorbereitung keine leicht flüchtigen und toxischen organischen Lösungsmittel benutzt werden, entfällt die Notwendigkeit, unter dem Abzug zu arbeiten. Die sonst nötige und ebenfalls kostspielige Entsorgung organischer Lösungsmittel entfällt.

6. Zusammenfassung

Es wird über eine Methode berichtet, die die Bestimmung von Plasma-Cortisol ohne Extraktion und chromatographische Vorreinigung erlaubt. Mit dieser Methode ist es möglich, aus 5 μ l Plasma oder Serum Cortisol zu bestimmen. Die Trennung des Cortisols vom Transcortin wird durch 15-minütiges Erhitzen des in saurem Puffer verdünnten Plasmas erreicht. Die Reproduzierbarkeit und Empfindlichkeit der Methode entspricht der des im Labor eingeführten Radioimmunoassays nach chromatographischer Reinigung des Extraktes. (43)

Mit dieser neuen Methode gemessene Normalwerte und Tagesprofile stimmen mit den Angaben in der Literatur überein.

Für die Durchführung der wichtigsten Nebennierenfunktionstests, wie Dexamethason- Suppressions- und Synacthen-Stimulations-Test, ist die Methode ebenfalls gut geeignet.

Für spezielle Fragestellungen beim kongenitalen, adrenogenitalen Syndrom liefert sie jedoch zu hohe Werte, was auf die geringe Spezifität der Antikörper gegenüber 17-alpha-OH-Progesteron zurückzuführen ist.

Die Methode ist einfach zu handhaben und wenig stör anfällig. Es können von einer eingearbeiteten Person pro Arbeitstag leicht 36 Plasmen im Doppelansatz bestimmt werden.

Da nicht mit flüchtigen, organischen Lösungsmitteln gearbeitet werden muss, entfällt die Gefahr toxischer Schädigung und damit die Notwendigkeit, unter dem Abzug zu arbeiten.

Auf Grund des hohen Probendurchsatzes und der Verwendung billiger Chemikalien lassen sich die Personal- und Material_Kosten verhältnismässig gering halten.

7. Tabellen:

Tabelle 11: Plasma-Cortisol, bestimmt mit drei Methoden.
(alle Werte in ug/l)

Plasma Nr.	Chrom.Assay Konz.	Schnell_Assay Konz.	Neuer Assay Konz.
1	109	157	110
2	353	391	322
3	452	490	520
4	748	970	756
5	75	98	85
6	294	350	312
7	76	98	82
8	313	336	278
9	449	580	462
10	699	985	684
11	89	132	84
12	356	402	328
13	86	125	84
14	270	325	272
15	135	175	121
16	341	448	360
17	170	231	173
18	323	388	338
19	310	402	390
20	582	803	710
21	240	341	239
22	418	570	452
23	73	119	81
24	337	429	302
25	101	125	53
26	291	388	226
27	109	141	79
28	384	449	346
29	264	264	240
30	437	589	408
31	345	465	412
32	766	842	602
33	61	75	54
34	344	421	290
35	168	218	113
36	328	399	278
37	106	143	111
38	383	407	370
39	88	114	82
40	292	330	328

Fortsetzung der Tabelle 11 auf S. 67

Plasma Nr.	Chrom.Assay Konz.	Schnell-Assay Konz.	Neuer Assay Konz.
41	128	185	147
42	408	473	444
43	351	500	428
44	231	358	259
45	259	340	273
46	198	230	172
47	283	361	298
48	168	223	162
49	355	462	236
50	359	515	390
51	387	561	440
52	70	184	109
53	278	387	388
54	161	232	182

Tabelle 12: Cortisolbestimmung im Plasma mit der
"Schnell-Methode" und der "neuen Methode"
(alle Werte in ug/l)

Plasma Nr.	Schnell-A. Konz.	Neuer A. Konz.	Plasma Nr.	Schnell-A. Konz.	Neuer A. Konz.
1	92	72	41	98	95
2	266	292	42	182	208
3	109	131	43	189	170
4	241	257	44	347	336
5	215	214	45	92	74
6	138	135	46	93	78
7	107	88	47	53	68
8	180	203	48	198	243
9	230	221	49	130	189
10	120	114	50	62	86
11	314	189	51	249	221
12	119	53	52	100	83
13	92	35	53	223	268
14	187	98	54	116	109
15	281	163	55	133	118
16	251	137	56	138	160
17	189	94	57	157	110
18	136	56	58	391	322
19	248	157	59	490	520
20	351	198	60	970	756
21	132	140	61	98	85
22	9	5	62	350	312
23	86	71	63	98	82
24	204	261	64	336	278
25	211	224	65	580	462
26	374	498	66	985	684
27	65	58	67	132	84
28	136	157	68	402	328
29	219	217	69	125	84
30	180	173	70	325	272
31	192	258	71	175	121
32	255	253	72	448	360
33	168	300	73	231	173
34	115	141	74	388	338
35	65	93	75	402	390
36	6	17	76	803	710
37	82	97	77	341	239
38	109	118	78	570	452
39	124	135	79	119	81
40	8	8	80	429	302

Fortsetzung der Tabelle 12 auf S. 69

Plasma Nr.	Schnell-A. Konz.	Neuer A. Konz.	Plasma Nr.	Schnell-A. Konz.	Neuer A. Konz.
81	125	53	126	258	176
82	388	226	127	320	306
83	141	79	128	235	191
84	449	346	129	24	3
85	264	240	130	219	164
86	589	408			
87	465	412	131	14	3
88	842	602	132	290	230
89	75	54	133	143	142
90	421	290	134	15	24
			135	129	103
91	218	113	136	204	136
92	399	278	137	15	12
93	143	111	138	30	12
94	407	370	139	187	122
95	114	82	140	144	93
96	330	328			
97	185	147	141	199	178
98	473	444	142	124	97
99	83	54	143	144	116
100	14	4	144	359	230
			145	9	5
101	121	87	146	70	45
102	21	133	147	134	15
103	257	207	148	133	1
104	204	210	149	142	95
105	105	142	150	143	163
106	54	55			
107	189	168	151	8	2
108	18	20	152	88	59
109	124	100	153	17	1
110	209	156	154	223	126
			155	164	105
111	99	74	156	120	73
112	500	428	157	70	30
113	80	78	158	184	96
114	376	173	159	116	44
115	185	150	160	162	105
116	358	259			
117	340	273	161	387	388
118	230	172	162	124	106
119	361	298	163	231	154
120	232	182	164	91	58
			165	19	2
121	223	162	166	26	1
122	462	236	167	610	504
123	515	390	168	840	700
124	561	440	169	142	87
125	184	109	170	74	44
			171	92	64

Tabelle 13: Cortisolbestimmung im Plasma mit der
"chromatographischen Methode" und der
"neuen Methode

(alle Werte in ug/l)

Plasma Nr.	Chrom.A. Konz.	Neuer A. Konz.	Plasma Nr.	Chrom.A. Konz.	Neuer A. Konz.
1	137	148	41	199	225
2	279	280	42	78	85
3	147	121	43	122	163
4	99	98	44	112	148
5	97	99	45	4	13
6	12	18	46	162	191
7	89	76	47	343	334
8	124	89	48 (+)	86	103
9	87	73	49	93	155
10	99	87	50 (+)	30	96
11	155	111	51	196	227
12	207	178	52	7	26
13	54	32	53	56	81
14	12	7	54	89	79
15	134	62	55	105	95
16	96	110	56	141	114
17	108	115	57	13	5
18	9	3	58 (+)	180	171
19	83	82	59	170	131
20	366	322	60	380	298
21	206	231	61	257	211
22	298	354	62	403	434
23	192	292	63	136	128
24	118	208	64	13	17
25	306	307	65 (+)	90	114
26	254	246	66	75	78
27	539	560	67	30	46
28	66	128	68	281	268
29	252	335	69	329	380
30	58	53	70	85	94
31	291	311	71	253	218
32	291	309	72 (+)	129	104
33	172	222	73	131	116
34	222	312	74	162	135
35	105	83	75 (+)	90	104
36	332	402	76	118	146
37	150	178	77	109	110
38	289	345	78	353	322
39	127	115	79	452	520
40	291	283	80	748	756

Fortsetzung der Tabelle 13 auf S. 71

Plasma Nr.	Chrom.A. Konz.	Neuer A. Konz.	Plasma Nr.	Chrom.A. Konz.	Neuer A. Konz.
81	75	85	121	131	121
82	294	312	122	351	428
83	76	82	123 (+)	231	259
84	313	278	124 (+)	259	273
85	449	462	125	198	172
86	699	684	126	283	298
87	89	84	127	161	182
88	356	328	128 (+)	168	162
89	86	84	129 (+)	355	236
90	270	272	130	359	390
91	135	121	131	387	440
92	341	360	132	70	109
93	170	173	133 (+)	24	226
94	323	338	134	78	78
95	310	390	135	97	70
96	582	710	136	242	208
97	240	239	137 (+)	255	149
98	418	452	138	189	192
99	73	81	139 (+)	5	48
100	337	302	140 (+)	42	124
101	101	53	141 (+)	10	13
102	291	226	142 (+)	23	70
103	109	79	143 (+)	205	236
104	384	346	144 (+)	106	92
105	264	240	145 (+)	140	124
106	437	408	146	104	98
107	345	412	147 (+)	47	60
108	766	602	148	47	120
109	61	54	149	52	54
110	344	290	150	278	388
111	168	113	151 (+)	17	41
112	328	278	152	19	74
113	106	111	153	7	12
114	383	370	154	7	23
115	88	82	155	3	1
116	292	328	156	2	13
117	128	147	157	55	53
118	408	444	158	344	396
119 (+)	12	96	159	131	90
120	68	74	160	347	248

Fortsetzung der Tabelle 13 auf S. 72

Plasma Nr.	Chrom.A. Konz.	Neuer A. Konz.	Plasma Nr.	Chrom.A. Konz.	Neuer A. Konz.
161	385	316	201	57	18
162	383	382	202	91	52
163	159	109	203	10	1
164	86	70	204	263	100
165	187	128	205	323	256
166	315	238	206	11	2
167	350	258	207	136	103
168	386	280	208	5	5
169	93	85	209	207	146
170	350	302	210	10	5
171	9	1	211	205	177
172	312	290	212	20	1
173	331	356	213	322	334
174	248	159	214	188	140
175	199	157	215	219	192
176	47	14	216	115	96
177	42	28	217	76	62
178	318	248	218	28	64
179	28	12	219	11	120
180	74	50	220	9	4
181	13	1	221	6	3
182 (+)	78	53	222	18	14
183 (+)	242	222	223	9	10
184	62	31	224	13	5
185	257	222	225	14	2
186	86	62	226	9	1
187	329	332	227	10	1
188	138	106	228	10	1
189	366	394	229	47	28
190	239	169	230	14	4
191	11	1	231	17	7
192	14	9	232	13	2
193	334	358	233	12	2
194	14	6	234	9	1
195	7	6	235	191	163
196	44	43	236	5	23
197	14	1	237	266	228
198	36	32	238	9	35
199	3	1	239	10	7
200	6	1	240	263	215

Fortsetzung der Tabelle 13 auf S. 73

Plasma Nr.	Chrom.A. Konz.	Neuer A. Konz.
------------	-------------------	-------------------

241	8	28
242	5	6
243	123	90
244	135	85
245	53	34
246	55	34
247	119	80
248	50	25
249	131	88
250	192	148

251	110	128
252	110	143
253	32	22
254	10	20
255	314	290
256	226	192
257	149	130
258	178	130
259	23	31
260	13	26

261	30	41
262	29	36
263	98	88
264	14	32
265	2	26

(+) : Die mit einem Kreuz gekennzeichneten Plasmen stammen von Patienten mit einem adrenogenitalen Syndrom.

Tabelle 14: Cortisolbestimmung im Plasma mit drei und daraus durch Zufallsauswahl gewonnenen zwei Messpunkten

(alle Werte in ug/l)

Plasma Nr.	3 Meßpkt. Konz.	2 Meßpkt. Konz.	Plasma Nr.	3 Meßpkt. Konz.	2 Meßpkt. Konz.
1	106	104	41	232	228
2	28	29	42	232	226
3	56	56	43	298	308
4	54	53	44	105	104
5	108	107	45	97	94
6	90	89	46	53	53
7	182	176	47	226	206
8	2	2	48	79	76
9	51	49	49	346	354
10	1	1	50	240	211
11	30	31	51	408	418
12	1	1	52	54	54
13	69	73	53	290	286
14	1	1	54	113	113
15	53	56	55	278	266
16	28	30	56	111	111
17	57	57	57	370	366
18	4	6	58	82	78
19	255	253	59	328	316
20	7	7	60	147	148
21	103	97	61	444	434
22	103	105	62	390	384
23	1	1	63	710	706
24	296	293	64	520	538
25	45	47	65	756	792
26	102	104	66	140	142
27	172	175	67	118	123
28	223	210	68	87	85
29	359	342	69	111	113
30	517	522	70	178	182
31	54	52	71	32	28
32	100	100	72	7	4
33	144	156	73	122	129
34	194	190	74	107	110
35	324	324	75	76	80
36	390	386	76	89	93
37	98	104	77	73	76
38	315	307	78	148	155
39	107	108	79	280	282
40	369	349	80	86	80

Fortsetzung der Tabelle 14 auf S. 75

Plasma Nr.	3 Meßpkt. Konz.	2 Meßpkt. Konz.	Plasma Nr.	3 Meßpkt. Konz.	2 Meßpkt. Konz.
81	36	30	121	394	364
82	104	92	122	9	8
83	148	131	123	95	103
84	237	223	124	118	123
85	317	322	125	103	110
86	404	404	126	106	112
87	62	56	127	106	112
88	122	110	128	106	112
89	162	132	129	109	115
90	186	160	130	91	98
91	352	314	131	103	108
92	416	406	132	95	100
93	49	41	133	98	103
94	49	41	134	114	119
95	73	72	135	103	102
96	197	190	136	130	123
97	119	103	137	1	4
98	48	40	138	50	49
99	22	20	139	223	203
100	67	65	140	100	92
101	103	103	141	58	52
102	116	115	142	210	207
103	85	86	143	47	35
104	302	290	144	139	137
105	159	164	145	94	101
106	358	362	146	248	237
107	157	154	147	193	192
108	14	12	148	85	75
109	28	28	149	135	125
110	248	240	150	122	115
111	12	15	151	32	22
112	50	48	152	7	7
113	1	6	153	64	68
114	53	52	154	119	116
115	222	230	155	37	35
116	31	31	156	1	1
117	222	218	157	85	89
118	62	62	158	12	5
119	332	320	159	36	35
120	106	108	160	96	108

Fortsetzung der Tabelle 14 auf S. 76

Plasma Nr.	3 Meßpkt. Konz.	2 Meßpkt. Konz.
------------	--------------------	--------------------

161	153	156
162	237	249
163	357	364
164	431	424
165	49	49
166	128	132
167	170	190
168	242	272
169	328	342
170	438	454
171	121	149
172	257	276
173	383	383
174	111	156
175	245	312
176	334	344
177	375	389

Tabelle 15: Cortisolbestimmung im Plasma mit Hilfe der "chromatographischen" und der "neuen" Methode vor und nach Stimulation mit Synacthen.

(alle Konzentrationen in ug/l)

Plasma Nr.	Chrom.A. Konz.	Neuer A. Konz.	Plasma Nr.	Chrom.A. Konz.	Neuer A. Konz.
1- 2	206-298	231-354	61- 62	138-366	106-394
3- 4	118-306	208-307	63- 64	137-279	148-280
5- 6	172-222	222-312	65- 66	254-539	246-560
7- 8	127-291	115-283	67- 68	105-332	83-402
9- 10	170-380	131-298	69- 70	231-259	259-273
11- 12	109-353	110-322	71- 72	168-355	162-236
13- 14	452-748	520-756	73- 74	10- 23	13- 70
15- 16	75-294	85-312	75- 76	78-242	53-222
17- 18	76-313	82-278	77- 78	83-366	82-322
19- 20	449-699	462-684	79- 80	150-289	178-345
21- 22	89-356	84-328	81- 82	162-343	191-334
23- 24	86-270	84-272	83- 84	257-403	211-434
25- 26	135-341	121-360	85- 86	281-329	268-380
27- 28	170-323	173-338	87- 88	198-283	172-298
29- 30	310-582	390-710	89- 90	97-242	70-208
31- 32	240-418	239-452	91- 92	131-385	90-316
33- 34	73-337	81-302	93- 94	62-257	31-222
35- 36	101-291	53-226	95- 96	239-334	169-358
37- 38	109-384	79-346	97- 98	263-323	100-256
39- 40	264-437	240-408	99-100	210-393	109-290
41- 42	345-766	412-602			
43- 44	61-344	54-290			
45- 46	168-328	113-278			
47- 48	106-383	111-370			
49- 50	88-292	82-328			
51- 52	128-408	147-444			
53- 54	55-344	53-396			
55- 56	187-389	128-258			
57- 58	93-350	85-302			
59- 60	86-366	62-332			

Tabelle 16: Cortisolbestimmung im Plasma mit Hilfe der "chromatographischen" und der "neuen" Methode vor und nach Suppression mit Dexamethason.

(alle Konzentrationen in ug/l)

Plasma Nr.	Chrom.A. Konz.	Neuer A. Konz.	Plasma Nr.	Chrom.A. Konz.	Neuer A. Konz.
1- 2	108- 9	115- 3	27-28	30- 2	41-26
3- 4	112- 4	148-13	29-30	229-17	240- 7
5- 6	196- 7	227-26	31-32	102-12	104- 2
7- 8	141-13	114- 5	33-34	191- 5	163-23
9-10	136-13	128-17	35-36	266- 9	228-35
11-12	359- 9	230- 5	37-38	18-10	20- 7
13-14	74-13	50- 1	39-40	292- 8	215-28
15-16	57- 6	18- 1	41-42	220- 7	115- 9
17-18	136- 5	103- 5	43-44	91-10	52- 1
19-20	207-10	146- 5	45-46	239-11	169- 1
21-22	205-20	177- 1	47-48	263-11	100- 2
23-24	128-10	110-20	49-50	36- 3	32- 1
25-26	238-13	192-26			

Tabelle 17: Cortisolbestimmung nach der "neuen Methode" im Plasma von 92 klinisch unauffälligen, männlichen Versuchspersonen.

VP	Uhrzeit h.min	Konz. ug/l	Alter J.Mon	VP	Uhrzeit h.min	Konz. ug/l	Alter J.Mon
1	7.30	223	4.01	31	12.50	77	26.10
2	7.30	58	11.04	32	14.00	94	3.07
3	7.45	210	0.03	33	14.00	32	7.04
4	7.45	248	8.11	34	14.30	114	9.09
5	7.45	193	9.01	35	15.00	91	23.09
6	8.00	65	6.08	36	15.30	73	10.10
7	8.00	152	10.00	37	15.32	46	10.08
8	8.00	138	11.05	38	15.34	124	9.11
9	8.00	180	7.11	39	15.38	46	10.11
10	8.00	180	11.06	40	15.40	43	10.00
11	8.00	237	15.01	41	15.44	109	10.06
12	8.00	156	9.11	42	15.46	50	10.10
13	8.00	175	9.07	43	15.48	63	11.01
14	8.00	83	0.04	44	15.52	135	11.08
15	8.00	194	5.00	45	15.54	100	11.07
16	8.00	41	0.02	46	15.56	31	11.02
17	8.00	170	0.03	47	15.58	59	12.08
18	8.00	135	15.11	48	16.00	52	12.01
19	8.00	224	10.00	49	16.00	90	21.01
20	9.00	115	15.10	50	16.00	49	26.01
21	10.00	56	25.00	51	16.02	47	12.06
22	10.00	54	24.01	52	16.04	40	12.02
23	10.00	108	25.02	53	16.05	78	6.11
24	10.00	63	25.06	54	16.08	50	12.00
25	10.30	82	26.00	55	16.10	37	12.01
26	11.00	96	20.04	56	16.12	85	12.10
27	11.00	217	24.02	57	16.14	107	13.06
28	11.00	60	19.11	58	16.16	65	13.05
29	12.30	131	25.01	59	16.18	95	13.01
30	12.40	100	25.03	60	16.20	168	13.01

Fortsetzung der Tabelle 17 auf S. 80

VP	Uhrzeit h.min	Konz. ug/l	Alter J.Mon.
----	------------------	---------------	-----------------

61	16.22	139	13.10
62	16.26	30	13.06
63	16.28	153	13.10
64	16.30	84	13.06
65	16.30	93	20.06
66	16.30	65	13.04
67	16.34	98	13.08
68	16.36	67	14.09
69	16.40	39	14.00
70	16.42	38	14.07

71	16.44	34	14.01
72	16.46	92	14.06
73	16.48	131	17.11
74	16.50	29	14.10
75	16.52	37	15.07
76	16.54	41	15.02
77	16.56	78	15.10
78	16.58	34	15.03
79	17.00	31	15.11
80	17.05	16	15.11

81	17.10	25	16.06
82	17.12	119	16.10
83	17.14	122	16.30
84	17.18	12	17.04
85	17.22	64	17.09
86	17.30	11	18.11
87	20.00	60	19.11
88	20.00	35	20.01
89	20.00	57	18.06
90	20.00	41	17.10

91	20.00	23	19.06
92	20.00	28	18.00

Tabelle 18: Erstellung von Cortisol-Tagesprofilen nach der "neuen Methode" im Plasma von 5 endokrinologisch unauffälligen, männlichen Versuchspersonen (VP)

(alle Konzentrationen in ug/l)

VP 1 (n=4)		VP 2 (n=5)		VP 3 (n=5)	
Uhrzeit h.min	Konz.	Uhrzeit h.min	Konz.	Uhrzeit h.min	Konz.
8.00	139	8.00	130	8.00	120
10.00	121	10.00	73	10.30	110
16.00	51	12.00	59	12.00	100
20.00	20	16.00	51	16.00	75
		20.00	12	20.00	43

VP 4 (n=4)		VP 5 (n=5)	
Uhrzeit h.min	Konz.	Uhrzeit h.min	Konz.
9.00	158	9.00	89
12.00	129	10.00	186
18.00	100	12.00	117
22.00	60	16.00	104
		20.00	72

8. Verdünnungsreihen

Verdünnungsreihe 1: Antikörperverdünnung

Nr.	Entnahme aus	Vol., in ml	Phosphatpuffer (Lösung 1), in ml	Titer
1	AK-haltigem Plasma	0,01	ad 5	1 : 500
2	AK-haltigem Plasma	0,02	ad 20	1 : 1 000
3	Nr. 2	1	ad 4	1 : 5 000
4	Nr. 2	1	ad 9	1 : 10 000
5	Nr. 2	1	ad 14	1 : 15 000
6	Nr. 2	1	ad 19	1 : 20 000
7	Nr. 2	0,5	ad 12	1 : 25 000
8	Nr. 2	0,5	ad 14,5	1 : 30 000
9	Nr. 2	0,5	ad 19,5	1 : 40 000
Erwünschter Titer bei Verwendung des AK 127: 1 : 5 000				
Erwünschter Titer bei Verwendung des AK 62: 1 : 25 000				

Verdünnungsreihe 2: Cortisol-Standardkonzentrationen

Nr.	Entnahme aus	Vol., in ml	Standardver- dünnung in ml (Lösung 2)	Cortisol- Konz. (ug/l)	Cortisol- Konz. (ng/0,01ml)
1	Cortisol-Stamm- lösung (Lösung 7)	1	ad 100	10 000	100
2	Nr. 1	1	ad 19	500	5
3	Nr. 1	1	ad 24	400	4
4	Nr. 1	0,5	ad 16,166	300	3
5	Nr. 1	0,5	ad 24,5	200	2
6	Nr. 1	0,25	ad 24,75	100	1
7	Nr. 1	0,1	ad 19,9	50	0,5

Im Assay benützte Standardkonzentrationen: 500, 400, 300,
200, 100 und
50 ug/l

Im Assay eingesetzte Volumina : 0,01 ml

Verdünnungsreihe 3: Wiederfindung von Cortisol-
Standardkonzentrationen

Stammprüfwert: 10 mg Cortisol auf 100 ml Äthanol absolut p.a.

Verdünnungsprüfwert: 1 ml aus Stammprüfwert entnehmen,
unter N₂ abdampfen und mit 100 ml
Standardverdünnung (Lösung 2) auffüllen

Nr.	Entnahme aus	Vol., in ml	Standardver- dünnung in ml (Lösung 2)	Cortisol- Konz. (ug/l)	Cortisol- Konz. (ng/0,01ml)
1	Verdünnungsprüf- wert (s.o.)	2	ad 0,5	800	8
2	" "	2	ad 1,332	600	6
3	" "	1	ad 1,5	400	4
4	" "	1	ad 2,33	300	3
5	" "	1	ad 4	200	2
6	" "	0,5	ad 4,5	100	1

Aus den Ansätzen 1 bis 6 je 1 ml entnehmen und mit je
1 ml Dexamethason-supprimiertem Plasma gut mischen.
Zu den eingesetzten Konzentrationen addieren sich die
Cortisolwerte des supprimierten Plasmas.

Im Assay benutzte Prüfkonzentrationen: 400,300,200,150,
100 und 50 ug/l

Im Assay eingesetzte Volumina: 0,01 ml

Verdünnungsreihe 4: Cortisol-Standardwerte zur
Antikörper-Kreuzreaktionstestung

Nr.	Entnahme aus	Vol., in ml	Phosphatpuf- fer in ml (Lösung 1)	Cortisol- Konz. (ug/l)	Cortisol- Konz. (ng/0,1 ml)
1	Cortisol-Stamm- lösung(Lösung 7)	1	ad 100	10 000	1 000
2	Nr. 1	1	ad 9	1 000	100
3	Nr. 2	1	ad 9	100	10
4	Nr. 3	1	ad 9	10	1
5	Nr. 4	1	ad 9	1	0,1
6	Nr. 5	1	ad 9	0,1	0,01

Im Assay benutzte Cortisol-Konzentrationen: 0,1, 1, 10,
100, 1000 und
10000 ug/l

Im Assay eingesetzte Volumina: 0,1 ml

Verdünnungsreihe 5: 17-alpha-OH-Progesteron-Standard-
werte zur Antikörper-Kreuzreaktions-
testung

Nr.	Entnahme aus	Vol., in ml	Phosphat- puffer in ml (Lösung 1)	17-alpha- OH.,Konz. (ug/l)	17-alpha- OH.,Konz. (ug/0,1ml)
1	17-alpha-OH-Pro- gesteron- Stammlösung (Lösung 8)	1	ad 100	10 000	1 000
2	Nr. 1	1	ad 9	1 000	100
3	Nr. 2	1	ad 9	100	10
4	Nr. 3	1	ad 9	10	1
5	Nr. 4	1	ad 9	1	0,1
6	Nr. 5	1	ad 9	0,1	0,01

Im Assay benutzte 17-alpha-OH-Progesteron-
Konzentrationen:

0,1, 1, 10, 100, 1000 und 10000 ug/l

Im Assay eingesetzte Volumina: 0,1 ml

Literaturverzeichnis

1. ABRAHAM, G.E.:
Solid-phase radioimmunoassay of
estradiol-17-beta.
J.clin.Endocr. 29 : 866-870, 1969
2. ABRAHAM, G.E.:
Radioimmunoassay of steroids in
biological materials.
Acta Endocrinol. 75 Suppl. 183, 1974
3. BINOUX, M.A. W.D. ODELL:
Use of dextrane-coated charcoal to
separate antibody-bound from free
hormone: A critique.
J.clin.Endocr. 36 : 303-310, 1973
4. BOTTERMANN, P., P.DIETERLE, W. HOCHHEUSER,
K.HORN, K.KOPETZ, K.SCHLEYPEN, K.SCHWARZ,
P.C.SCRIBA:
Zur Frage der endokrinen Nebenwirkungen
von Ovulationshemmern, Einfluss auf
Glucosetoleranz, unveresterte Fettsäuren,
Insulin- und Cortisol-Spiegel sowie auf
proteingebundenes Jod und Trijodthyronin
im Serum.
Münch.med.Wschr. 109 : 685-691, 1967
5. BOWMAN, R.E.:
Ultramicromethod for nonconjugated
17-beta-corticosteroids in one-half
milliliter of monkey or human plasma.
Analyt. Biochem. 19 : 166-176, 1967
6. BREUER, H., W.NOCKE:
Bestimmung von Steroidhormonen.
Der Internist 9. Jahrgang,
2 : 63-70, 1968
7. BREUER, H., L.NOCKE, L.SICKMANN:
Neuere Methoden zur Bestimmung von
Steroidhormonen.
Z.klin. Chem.klin. Biochem.
8 : 329-338, 1970

8. BREUER, H.:
Methodische Schwierigkeiten der Protein-
bindungsmethoden zur Bestimmung von
Steroidhormonen.
Z.klin. Chem.klin. Biochem.
11 : 357-361, 1973
9. COCHLAN, J.B., J.R. BLAIR-WEST:
In: Hormones in blood. 2.Auflage,
hrsg.v. C.H. Gray, A.L. Bacharach.
Academic Press, New York 391-488, 1967
10. DAUGHADAY, W.H., R.E.ADLER, J.K.MARIZ and
D.C. RASINSKI:
Measurement of the binding capacity
of corticosteroid binding globulin in
human plasma.
J.clin.Endocr. 22 : 704-710, 1962
11. DE MOOR, P., P.OSINSKI, R.DECKX and O.STENO:
The specificity of fluorimetric corticoid
determination.
Clin.Chem.Acta 7 : 475-481, 1962
12. DIXON, P.F., M.BOOTH, J.BUTLER:
The corticosteroids.
In: Hormones in blood 2 nd. Edition.
C.H.Gray, A.L. Bacharach (Eds.)
2 : 305-389, Academic Press, New York, 1967
13. DONOHUE, J., D.SGOUTAS:
Improved radioimmunoassay of plasma
cortisol.
Clin.Chem. 21 : 770-773, 1975
14. DUNN, R.T., L.B.FOSTER:
Radioimmunoassay of thyroxine in
unextracted serum by a single antibody
technique.
Clin.Chem. 19 : 1063-1066, 1973
15. DUNN, R.T., L.B.FOSTER:
Radioimmunoassay of serum folate.
Clin.Chem. 19 : 1101-1104, 1973

16. FARMER, R.W., C.E.PIERCE:
Plasma Cortisoldetermination:
radioimmunoassay and competitive-protein-
binding compared.
Clin.Chem. 20/4 : 411-414, 1974
17. FOSTER, L.B., R.T.DUNN:
Single-antibody technique for radio-
immunoassay of cortisol in unextracted
serum or plasma.
Clin.Chem. 20 : 365-368, 1974
18. GEISEN, K., S.MAHAL, A.SCHWENK:
Fluorometrische Bestimmung der unkon-
jugierten 11-beta-Hydroxycorticosteroide
in kleinen Serumvolumina (0,1-0,3 ml)
und ihre Bedeutung in der pädiatrisch-
endokrinologischen Diagnostik.
Z.Kinderheilk. 107 : 175-190, 1969
19. GLENN, E.M., D.H.NELSON:
Chemical method for the determination
of 17-hydroxycorticosteroids in urine
following hydrolysis with beta-glucu-
ronidase.
J.clin.Endocr. 13 : 911-921, 1953
20. GOTTLIEB, C., K.S.LAU, L.R.WASSERMANN, V.HERBERT:
Rapid charcoal assay for intrinsic
factor, gastric juice unsaturated B₁₂
binding capacity, antibody to IF and
serum unsaturated B₁₂ binding capacity.
Blood 25 : 875-884, 1965
21. GRAEF, V., HJ.STAUDINGER:
Untersuchungen zur Spezifität der
fluorometrischen Bestimmung der
11-Hydroxycorticosteroide im Plasma.
Z.klin.Chem. klin.Biochem. 8 : 368373, 1970
22. GUILLEMIN, R.:
Hypothalamic control of the secretion of
adrenohypophysial hormones.
In: Advances in Metabolic Disorders,
Bd. 5, S. 1, Academic Press, New York, 1971

23. HAMANAKA, Y., H.MANABE, H.TANAKA, Y.MONDEN,
T.VOZUMI, K.MATSUMOTO:
Effects of surgery on plasma levels of
cortisol, corticosterone and non-protein-
bound cortisol.
Acta Endocrinol.(Kbh) 64 : 439-451, 1970

24. HELLMAN, L., F.NAKADA, J.CURTI, E.D.WEITZMAN,
J.KREAM, H.ROFFWARG, S.ELLMAN, D.K.FUKUSHIMA,
T.F.GALLAGHER:
Cortisol is secreted episodically by
normal man.
J.clin.Endocr. 30 : 411-422, 1970

25. HOCHHEUSER, W., F.MARGUTH, M.MÜLLER-BARDORFF,
K.SCHWARZ, P.C.SCRIBA, H.THIELE:
Diagnostische Bedeutung der Protein-
bindung von Plasmacortisol bestimmt
durch Dextrangelfiltration.
Klin.Wschr. 47 : 300-309, 1969

26. KLUGE, F., A.C.GERB, N.BOSS, R.FAHLBUSCH,
P.C.SCRIBA:
Eine verbesserte fluorimetrische
Cortisolbestimmung im Serum:
Diagnostische Bedeutung und thera-
peutische Folgerungen bei NNR-
Insuffizienz.
Klin.Wschr. 48 : 929-934, 1970

27. KNORR, D. :
Ultrareine Glasgeräte durch Ausheizen
bei 500° C.
Z.klin.Chem.klin.Biochem. 9 : 145, 1971

28. KNORR, D., F.BIDLINGMAIER, H.SEIDEL:
Gaschromatographische Bestimmung des
17-Hydroxyprogesterons im Plasma mit
Elektroneneinfangdetektor.
Z.Anal.Chem. 259 : 221-222, 1972

29. KNORR, D., F.BIDLINGMAIER, O.BUTENANDT,
K.v.SCHNAKENBURG, W.WAGNER:
A test for heterozygoticy in congenital
adrenal hyperplasia (CAH).
In.: P.A.LEE, L.P.PLOTNICK, A.A.KOWARSKI,
C.J.MIGEON (Eds.)
Congenital adrenal hyperplasia 495-500,
University Park Press, Baltimore, 1977

30. LEWBART, M.L., V.R.MATTOX:
The mechanism of the Porter-Silber-
reaction.
I.Rearrangement of the dihydroxyacetone
group of steroids.
J.org.Chem. 29 : 513-521, 1964
II.Formation of 17-deoxysteroidal
21-phenylhydrazons.
J.org.Chem. 29 : 521-527, 1964
31. LEYENDECKER, G., S.WARDLAW, W.NOCKE:
Gamma-globulin-protection of
radioimmunoassay and competitive-
protein-binding saturation analysis
of steroids.
J.clin.Endocr. 34 : 430-433, 1972
32. LINNING, F.J., J.MANDEL:
Which measure of precision?
The evaluation of the precision of
analytical methods in involving linear
calibration curves.
Anal.Chem. 36 : 25A-29A, 32 A, 1964
33. MAUTHE, J., H.LASPE, D.KNORR:
Zur Häufigkeit des kongenitalen
adrenogenitalen Syndroms (AGS):
München 1963 - 1972.
Klin.Pädiat. 189 : 172-176, 1977
34. McCANN, S.M., J.C.PORTER:
Hypothalamic pituitary stimulating and
inhibiting hormones.
Physiol.Rev. 49 : 240-284, 1969
35. MILLER, O.N.:
Determination of bound vitamin B₁₂ .
Arch.Biochem.Biophys. 68 :
255-262, 1957
36. MURPHY, B.E.P. :
Some studies on the protein binding
of steroids and their applications
to the routine micro and ultramicro
measurement of various steroids in
body fluids by competitive protein-
binding radioassay.
J.clin.Endocr. 27 : 973-990, 1967

37. MURPHY, B.E.P.:
Clinical evaluation of urinary cortisol
determination by competitive protein-
binding radioassay.
J.clin.Endocr. 28 : 343-348, 1968
38. MURPHY, B.E.P.:
Protein-binding and the assay of
nonantigenic hormones.
Recent progress of hormone
research 25 : 563-610, 1969
39. NENITA, F., D.A.HILLMAN, E.COLLE:
Measurement of plasmacortisol in
children and adults: a comparison of
the double isotope derivative assay,
competitive protein-binding analysis
and the modified competitive protein-
binding analysis.
J.clin.Endocr. 30 : 185-189, 1970
40. NEWSOME, H.H.Jr., A.S.CLEMENS, E.H.BORUM:
The simultaneous assay of cortisol,
corticosterone, 11-deoxycortisol and
cortisone in human plasma.
J.clin.Endocr. 34 : 473-483, 1972
41. NUGENT, C.A., T.NICHOLS, F.H.TYLER:
Diagnosis of Chushings' syndrome.
Single dose dexamethasone suppression
test.
Arch. intern.Med. 116 : 172-176, 1965
42. PAVLATOS, F.C., R.P.SMILO, P.H.FORSHAM:
A rapid screening test for Cushings
syndrome.
J.amer.med.Ass. 193 : 720-723, 1965
43. PHAM-HUU-TRUNG, M.T., M.GOURMELEN, F.GIRARD:
The simultaneous assay of cortisol
and 17-alpha-hydroxyprogesterone in
the plasma of patients with congenital
adrenal hyperplasia.
Acta endocr. 74 : 316-330, 1973

44. PIRKE, K.M., D.STAMM:
Vergleich der Spezifität einfacher
Methoden zur Bestimmung von Plasma-
cortisol. 1.Mitteilung:
Porter-Silber-Methode und fluoro-
metrische Verfahren.
Z.klin.Chem. 10 : 243-253, 1972
45. PORTER, C.C., R.H.SILBER:
A quantitative colour reaction for
cortisone and related 17,21 dihydroxy-
20-ketosteroids.
J.biol.Chem. 185 : 201-207, 1950
46. PRADER, A.:
Die Häufigkeit des kongenitalen
adrenogenitalen Syndroms.
Helv.Paed.Acta 14 : 426-431, 1958
47. REDDY, W.J., D.JENKINS, G.W.THORN:
Estimation of 17-hydroxycorticoids
in urine.
Metabolism 1 : 511-527, 1952
48. Richtlinien zur Durchführung von Maßnahmen der
statistischen Qualitätskontrolle und
von Ringversuchen in der Heilkunde
(Deutsches Ärzteblatt 68 : 2228-2231,
aufgrund des "Gesetzes über das Mess-
und Eichwesen (Eichgesetz)" v.
11. Juli 1969, BGB v. 15. Juli 1969,
Teil 1, S.759-770, und der "Verordnung
über Ausnahme von der Eichpflicht
(Eichpflichtausnahmereverordnung)"
vom 26. Juni 1970, Bundesgesetzblatt
v. 30. Juni 1970, S. 960-965.
49. RUDER, H.J., R.L.GUY, M.B.LIPSETT:
A radioimmunoassay for cortisol in
plasma and urine.
J.clin.Endocrin. 35 : 219-224, 1972
50. SANDBERG A.A., W.R. SLAUNWHITE:
I. Transcortin: a corticosteroid binding
protein of plasma.
J.clin.Invest. 38 : 384, 1959
II. Levels on various conditions and
the effect of estrogens.
J.clin.Invest. 38 : 1290-1297, 1959

51. SCRIBA, P.C., A.C.GERB, F.KLUGE, N.BOSS, O.A.MÜLLER:
Eine verbesserte fluorimetrische
Serumcortisolbestimmung.
Z.anal.Chem. 252 : 284-287, 1970
52. SCRIBA, P.C., O.A.MÜLLER:
Fluorometrische Bestimmung von
Cortisol im Serum
In: BREUER, H., D.HAMEL, H.L.KRUSKEMPER:
Methoden der Hormonbestimmung,
Thieme Verlag Stuttgart, 176-182, 1975
53. SILBER, R.H., R.D.BUSCH, R.OSLAPAS:
Practical procedure for estimation of
corticosteron or hydrocortisone.
Clin.Chem. 4 : 278, 1958.
54. SLAUNWHITE:
Inactivity in viro of transcortin-
bound cortisol.
Science 135 : 1062-1063, 1962
55. TAMM, J.:
Methodik, Fehlerquellen und Deutung
der Corticosteroidbestimmung im Harn.
Internist (BERL.) 4 : 559-566, 1963
56. VERMEULEN, A., M.VAN DER STRAETEN:
Determination of plasma cortisol by
a fluorimetric method.
J.clin.Endocr. 24 : 1188-1194, 1964
57. VOIGT, K.D., H.SCHMIDT:
Hydrolyse von Steroidkonjugaten.
In: Methoden der enzymatischen Analyse,
hrsg.v.
H.V.Bergmeyer, Verlag Chemie,
Weinheim/Bergstr.,
2 : 1784-1793, 1970
58. WIDE, L., A.KILLANDER:
A radiosorbent technique for the assay
of serum vitamin B₁₂.
Scand.J.Clin.Lab.Invest. 27 : 151-155, 1971

59. WOOD, L.C., R.RICHARDS, S.H.INGBAR:
Interference in the measurement of plasma
11-hydroxycorticosteroids caused by
spironolactone administration.
New Engl. J.Med. 282 : 650-652, 1970
60. YALLOW, R.S., S.A.BERSON:
Assay of plasma insulin in human
subjects by immunological methods.
Nature 184 : 1648-1649, 1959.

Lebenslauf

5. April 1950 geboren in Ravensburg
Vater: Matthias Auchter, Oberpfleger
Mutter: Anna Auchter, geb. Hirsch

1956 Volksschule Weißenau

1961 Neues Gymnasium Ravensburg

1969 Abitur

1969 Wehrdienst in der Bundeswehr

1971 Beendigung des Wehrdienstes als
Offizier d.R.

1971 Beginn des medizinischen Studiums an
der Ludwig Maximilians-Universität zu
München

1972 Naturwissenschaftliche Vorprüfung

1974 Ärztliche Vorprüfung

1975 1. medizinisches Staatsexamen

1977 2. medizinisches Staatsexamen

1977 Internatsjahr in der 1. chirurgischen
Klinik Augsburg, der 2. Universitäts-
frauenklinik München und dem städt.
Krankenhaus München-Schwabing

1977 Immatrikulation für das Studium der
Zahnmedizin

1978 3. medizinisches Staatsexamen

Dissertations- und Fotodruck ANNELIESE SCHUBERT
Corneliusstraße 21 • 8000 München 5 • Telefon 268177

